

Thais Regina Garlet

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
SÍNDROME DE DOWM**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia, área de
concentração Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm
Filho

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Garlet, Thais Regina

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN / Thais
Regina Garlet ; orientador, Danilo Wilhelm Filho -
Florianópolis, SC, 2013.

103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Estresse Oxidativo. 3. Síndrome de Down
. 4. Antioxidantes. I. Wilhelm Filho, Danilo . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Avaliação de Biomarcadores de Estresse Oxidativo
em crianças e adolescentes com Síndrome de Down”**

POR


Thais Regina Garlet

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

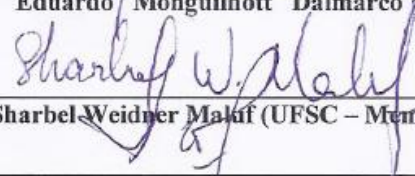
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho (UFSC – Orientadora)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 05 de fevereiro de 2013.

Àquela que é o alicerce da minha vida,
que me dá forças e me renova a cada
gesto de carinho. E de puro amor e
carinho são feitos todos os seus gestos,
sem exceção.

AGRADECIMENTOS

Aos meus maiores amores, meus familiares, que perto ou longe sempre torceram por mim. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos, sempre apoiando, incentivando, aconselhando, dando todo o suporte, amor e carinho.

À minha mãe, que é muito mais que isso, é amiga, filha, irmã, meu maior alicerce e exemplo. Obrigada pela companhia, companheirismo de todos os dias, confiança, por compreender os momentos difíceis, por tudo que aprendi com ela e por ser exemplo de persistência e força de vontade. Ao meu pai (*in memoriam*) sempre presente através dos seus valiosos ensinamentos de bondade, respeito e humildade. Pela honra de ter convivido com ele. Ao meu irmão, pela paciência, amizade, cuidado, por ser companheiro, conselheiro e um pai também. Não há palavras suficientes para que eu possa demonstrar todo o meu amor, gratidão e admiração por vocês!

Ao meu orientador, professor Dr. Danilo Wilhelm Filho por todo empenho, paciência, conhecimento, confiança e lição de vida compartilhados desde o estágio de Iniciação Científica até o final desta orientação. Sou muito grata por esta oportunidade!

Aos colegas e amigos do laboratório de Ecofisiologia Respiratória e vizinhança pela amizade e momentos de descontração. Em especial ao Eduardo por tudo o que me ensinou, por toda a ajuda desde o início, por compartilhar muito mais que o projeto que desenvolvemos juntos, pelo companheirismo inquestionável. À Patricia Budni, pelo suporte. Com certeza teria sido tudo mais difícil sem a presença de vocês.

À Profa. Dra. Emília Addison Machado Moreira, e suas alunas Letícia, Maiara e demais meninas da nutrição. Ao Prof. Dr. Eduardo Dalmarco, Profa. Dra. Arianne Zamoner, Andréia Giaretta e todos os profissionais que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos pais e crianças que participaram deste projeto por toda a paciência, compreensão e contribuição ímpar, que foi muito além dos dados e resultados obtidos. Às instituições que contribuíram com a localização das famílias que participaram do estudo, estrutura física e colaboração dos funcionários, parabéns pelo trabalho exemplar que desenvolvem e muito obrigado por toda a ajuda e acolhimento.

Aos meus amigos de perto e principalmente os de longe. Sou grata por vocês existirem e fazerem parte da minha vida, por tudo que

compartilhamos juntos e por vocês terem sempre dado força e acreditado em mim. Obrigada pela amizade verdadeira.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas/UFSC pelos ensinamentos transmitidos durante a minha formação acadêmica e profissional. Aos colegas da graduação e do curso de Pós-Graduação pelos momentos partilhados e bom convívio. À UFSC pela oportunidade de ensino/pesquisa de qualidade. Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha formação. Aos professores membros da banca de avaliação deste trabalho.

À Deus, por iluminar e guiar meu caminho, me dar forças para seguir em frente sempre, e por todas as oportunidades a mim oferecidas.

Obrigada a todos!

RESUMO

A Síndrome de Down (SD) é a condição genética que constitui uma das causas mais frequentes de deficiência mental. A cópia extra do cromossomo 21, que caracteriza esta síndrome, promove um desequilíbrio genético-bioquímico que resulta em um elevado estresse oxidativo, o qual está relacionado com a presença de envelhecimento precoce, mecanismos de carcinogênese e alterações neuropatológicas nestes indivíduos. O objetivo deste estudo foi avaliar o *status* antioxidante e biomarcadores de estresse oxidativo no sangue de crianças e adolescentes com SD, pela análise das defesas antioxidantes enzimáticas, como atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione transferase (GST), e não enzimáticas, como os níveis de glutathione reduzida (GSH), ácido úrico (AU) e vitamina E, além de indicadores de dano oxidativo, como os níveis de proteínas carboniladas (PC) e lipoperoxidação (concentração de TBARS), nos portadores de SD participantes deste estudo (n=20), comparativamente aos controles (n=18). A análise das enzimas antioxidantes mostrou um aumento significativo na atividade da enzima SOD (47,2%), CAT (24,7%) e GR (49,6%) nos indivíduos SD. Não foi encontrada diferença significativa na atividade da GPx enquanto a atividade da GST foi diminuída (61,2%), ambas respostas podendo ter relação com a depleção dos níveis de GSH (24,9%). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de TBARS, enquanto os níveis de PC apresentaram-se diminuídos (31,7%) em relação aos controles saudáveis, podendo ser consequência do aumento (16,1%) nos níveis séricos de AU, repetidamente observado em portadores de SD. Os níveis de vitamina E não mostraram diferença significativa entre os indivíduos SD em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos mostram um estado pró-oxidante sistêmico em indivíduos com SD, evidenciado pelo aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes, depleção da GSH sanguínea e níveis elevados de AU plasmático, provavelmente como compensação face o desequilíbrio do estado redox nestes indivíduos.

Palavras-chave: Síndrome de Down, Estresse Oxidativo, Antioxidantes.

ABSTRACT

Evaluation of oxidative stress biomarkers in children and teenagers with Down syndrome.

Down syndrome (DS) is a genetic condition that constitutes one of the most frequent causes of mental retardation. The extra copy of chromosome 21, which characterizes this syndrome, promotes a genetic-biochemical imbalance that results in a high systemic oxidative stress, which is related to the presence of premature aging, carcinogenesis and neuropathological changes in these individuals. The aim of this study was to evaluate the antioxidant status and oxidative stress biomarkers in the blood of children and teenagers with DS, by the analysis of enzymatic antioxidant defenses, such as the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione transferase (GST), and non-enzymatic antioxidants, such as levels of reduced glutathione (GSH), uric acid (UA) and vitamin E, as well as indicators of oxidative damage, as levels of protein carbonyls (PC) and lipid peroxidation (TBARS) of DS individuals participants in this study (n=20) compared to controls (n=18). The analysis of antioxidant enzymes showed a significant increase in the activities of SOD (47.2%), CAT enzyme (24.7%) and GR (49.6%) in DS subjects. There was no significant difference in GPx activity while GST activity was decreased (61.2%), both responses may be related to depletion (24.9%) of GSH levels. There were no significant differences in TBARS levels, while PC levels showed decreased (31.7%) compared to healthy controls, which may be a consequence of the increase (16.1%) in serum UA, repeatedly observed in patients with DS. Levels of vitamin E showed no significant differences between DS individuals compared to controls. The results showed a systemic pro-oxidant status in DS individuals, evidenced by the increase in the activity of some antioxidant enzymes and decreased GSH levels present in blood and elevated UA levels in plasma, probably as a compensation related to the redox imbalance in DS individuals.

Keywords: Down syndrome, Oxidative Stress, Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cariótipo de Trissomia 21.....	28
Figura 2: Formação mitocondrial de EROs e ERNs.....	41
Figura 3: Defesas antioxidantes enzimáticas.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	62
Gráfico 2: Atividade da Catalase (CAT) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	63
Gráfico 3: Atividade da Glutathione peroxidase (GPx) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	63
Gráfico 4: Atividade da Glutathione redutase (GR) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	64
Gráfico 5: Atividade da Glutathione S-transferase (GST) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	64
Gráfico 6: Concentração de Glutathione reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	65
Gráfico 7: Concentração de Ácido úrico (AU) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	65
Gráfico 8: Concentração de Vitamina E no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	66
Gráfico 9: Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	66
Gráfico 10: Concentração de Proteínas carboniladas (PC) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down e grupo controle saudável.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β	β -Amilóide
AGEs	Produtos Finais de GlicaçãoAvançada
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
AU	Ácido Úrico
CAT	Catalase
CBS	Gene Cistationina- β -Sintase
Cu	Cobre
DA	Doença de Alzheimer
diTyr	Ditirosina
DSCR	Região Crítica para a Síndrome de Down
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EO	Estresse Oxidativo
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GR	Glutational Redutase
GPx	Glutational Peroxidase
GSH	Glutational Reduzida
GSSG	Glutational Oxidada
GST	Glutational S-Transferase
IMC	Índice de Massa Corporal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HO \bullet	Radical Hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HClO $^{-}$	Ácido Hipocloroso
Kb	Quilobases

LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPO	Lipoperoxidação
Mb	Megabases
MDA	Malondialdeído
Mn	Manganês
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
•NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂ •-	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pb	Pares de bases
PC	Proteína Carbonilada
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PPA	Gene Precursor da Proteína β-Amilóide
RO•	Radical alcóxil
ROO•	Radical peróxil
ROOH	Hidroperóxido lipídico
SD	Síndrome de Down
SOD	Superóxido Dismutase
SOD1	Cu/Zn Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
8-OHdG	8-hidroxiguanosina

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. SÍNDROME DE DOWN	27
2.1.1. Aspectos gerais	27
2.1.2. Etiologia e Base Genética	30
2.1.3. Aspectos Clínicos	33
2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	38
2.3. DEFESAS ANTIOXIDANTES	41
2.4. ESTRESSE OXIDATIVO	44
2.4.1. Dano ao DNA	45
2.4.2. Dano Proteico	45
2.4.3. Peroxidação Lipídica	46
2.5. ESTRESSE OXIDATIVO E A SÍNDROME DE DOWN	47
3. OBJETIVOS	52
4. METODOLOGIA	53
4.1.DELINEAMENTO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS	53
4.1.1. Critérios de inclusão	53
4.1.2. Critérios de exclusão	53
4.1.3. Dados obtidos	53
4.1.4. Definições	54
4.1.5. Coleta de amostras biológicas	54
4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	54
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	55
4.4. EQUIPAMENTOS	55
4.5. REAGENTES	56
4.6. DEFESAS ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	56
4.6.1. Defesas antioxidantes enzimáticas	56
4.6.1.1. Superóxido Dismutase (SOD)	56
4.6.1.2. Catalase (CAT)	57

4.6.1.3. Glutationa Peroxidase (GP _x)	57
4.6.1.4. Glutationa Redutase (GR)	58
4.6.1.5. Glutationa S-transferase (GST)	58
4.6.2. Análise das Defesas Antioxidantes não Enzimáticas	58
4.6.2.1. Glutationa Reduzida (GSH)	58
4.6.2.2. Ácido Úrico (AU)	59
4.6.2.3. Vitamina E	59
4.6.3. Determinação dos Marcadores de Dano	60
4.6.3.1. Lipoperoxidação tecidual - TBARS	60
4.6.3.2. Proteína Carbonilada (PC)	60
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5. RESULTADOS	62
5.1. CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA DA POPULAÇÃO ESTUDADA	62
5.2. DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS	62
5.2.1. Atividade da SOD	62
5.2.2. Atividade da CAT	63
5.2.3. Atividade da GP _x	63
5.2.4. Atividade da GR	64
5.2.5. Atividade da GST	64
5.3. DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS	65
5.3.1. Glutationa Reduzida (GSH)	65
5.3.2. Ácido Úrico (AU)	65
5.3.3. Vitamina E	66
5.4. DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO	66
5.4.1. TBARS (Lipoperoxidação)	66
5.4.2. Proteína Carbonilada (PC)	67
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	75
8. PERSPECTIVAS	76
REFERENCIAS	77

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101
ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM SERES HUMANOS	103

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é uma anomalia cromossômica que ocorre devido à triplicação parcial ou completa do cromossomo 21, e é a causa mais comum de deficiência genética intelectual. Esta síndrome pode ser considerada uma doença multifatorial, onde uma expressão anormal de genes trissômicos decorre não apenas da genética, mas também da influência de fatores externos (PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2011).

A prevalência de nascimentos de indivíduos SD aumenta com a idade materna, já que a maioria dos casos de Trissomia 21 é decorrente da não disjunção meiótica que ocorre no cromossomo 21. Para gestantes com menos de 25 anos, a probabilidade de nascimento de uma criança portadora de SD é de aproximadamente 1 para cada 1500 nascimentos, aumentando para cerca de 1 em 100 nascimentos com idade materna de 40 anos (NOBLE, 1998).

A cópia extra do cromossomo 21 afeta muitas características fenotípicas e fisiológicas. A SD é caracterizada por deficiência mental, imunodeficiência, risco aumentado de leucemia, envelhecimento precoce e alterações neuropatológicas semelhantes às encontradas na Doença de Alzheimer (DA), antecipadamente, entre 30 e 40 anos (GARCEZ; PERES; SALVADOR, 2005; ELLIS *et al.*, 2008). Além disso, pessoas com SD são mais susceptíveis a infecções, doença cardíaca congênita e a disfunções da tireóide (ANI; GRANTHAM-MCGREGOR; MULLER, 2000).

Desta forma, características como envelhecimento precoce e aparecimento da DA em adultos jovens chamam a atenção. Mas por que isto aconteceria nas pessoas com SD tão enfaticamente? A resposta parece estar centrada no estresse oxidativo que estas pessoas estão submetidas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

O metabolismo aeróbio apresenta uma série de reações que podem formar espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) as quais desempenham importantes funções no organismo, como por exemplo, no sistema de defesa e, na regulação da sinalização celular e da expressão gênica. EROs e ERNs têm importante função biológica, por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de uma regulação eficiente do sistema antioxidante, que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

O estresse oxidativo (EO) é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de

defesa antioxidante e de reparo do organismo (SIES, 1985), tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula, contribuindo para os processos de envelhecimento e doenças, e/ou causando morte celular por apoptose ou necrose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; MARQUES; MARREIRO, 2006).

O equilíbrio e complementariedade entre a atividade das diferentes enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante. Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do EO. Os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) são convertidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1). O H_2O_2 formado é, então, neutralizado pela ação da GPx e CAT, independentemente (PINTO *et al.*, 2002).

Na SD, há um aumento na atividade da enzima SOD1, a qual está localizada no cromossomo 21 (região 21q22) (MARQUES; MARREIRO, 2006). Muitos estudos têm demonstrado um aumento na atividade de outras enzimas antioxidantes como uma resposta fisiológica visando eliminar o excesso de H_2O_2 produzido pela SOD1. Porém, o aumento na atividade da SOD1 é muito maior do que o percentual de aumento usualmente descrito na atividade das demais enzimas antioxidantes. Assim sendo, este desequilíbrio proporciona um quadro de agressão, devido à formação do radical hidroxil (HO^{\bullet}), que é o radical livre de oxigênio mais lesivo ao organismo (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2007), o qual tem relação com características como envelhecimento precoce, alterações neurológicas e hematológicas frequentemente associadas à SD (AGUILAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003).

Desta forma, este estudo é de extrema relevância para a comunidade científica e para os profissionais da área da saúde, pois deverá permitir uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da SD, visando estratégias terapêuticas para prevenir e amenizar as doenças neurodegenerativas, bem como o envelhecimento precoce e outras consequências associadas à presença de EO sistêmico nestes indivíduos, no sentido de contribuir inclusive para uma maior sobrevida destas pessoas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SÍNDROME DE DOWN

2.1.1. Aspectos Gerais

A Síndrome de Down (SD) é sem dúvida a mais comum e a mais conhecida das aberrações cromossômicas (SNUSTAD; SIMMONS, 2010). O reconhecimento desta síndrome como uma manifestação clínica só ocorreu em 1866, quando o doutor Amed John Langdon Down, superintendente médico do Hospital Earlswood, abrigo para crianças com retardo mental em Surrey, na Inglaterra, descreveu um conjunto de crianças com características comuns que eram distintas de outras crianças com retardo mental. Ele as chamou de "mongolóides" devido ao fato de que essas crianças pareciam pessoas da Mongólia, supondo erroneamente que esse fenótipo característico fosse consequência da tuberculose presente nos genitores (DOWN, 1866; WARD, 1999; SILVA; DESSEN, 2002; PUESCHEL, 2006).

O termo usado por Down, dentre outras denominações utilizadas para definir os indivíduos portadores de trissomia 21, tais como: imbecilidade mongolóide, idiotia mongoloide, cretinismo furfuráceo, acromicria congênita, criança mal-acabada, criança inacabada, dentre outros, foram considerados fortemente pejorativos e retirados do uso científico. Em decorrência disto, estas terminologias foram suprimidas das publicações da Organização Mundial de Saúde (OMS) a partir de 1965, prevalecendo a denominação Síndrome de Down para definir estas pessoas (SILVA; DESSEN, 2002; PUESCHEL, 2006).

Ao longo do tempo, outras causas infecciosas, metabólicas e de má formação do feto foram relacionadas ao aparecimento das características descritas por Down, no entanto, com o conhecimento que temos hoje da sua frequência e de seu fenótipo, é difícil acreditar que ela só tenha sido identificada em 1866. É provável que a ausência destas evidências se deva às altas taxas de mortalidade infantil da época (LESHIN, 2000).

Depois desse trabalho inicial, vieram outros que contribuíram para aprofundar o conhecimento sobre a SD. Na primeira parte do século XX, houve muita especulação sobre sua causa, sendo que os primeiros pesquisadores a relacionar a SD com a presença de anormalidades cromossômicas foram Waardenburg e Bleyer em 1930. Mas apenas em 1959, quase simultaneamente, Jerome Lejeune e Patricia

Jacobs, e seus respectivos colaboradores, determinaram como causa da SD a presença de três cópias do cromossomo 21 ao invés de duas cópias (KORENBERG *et al.*, 1992; SILVA; DESSEN, 2002). Casos de SD devido à translocação e mosaicismo foram descritos ao longo dos próximos três anos e, em 1974 Nebuhr sugeriu que o fenótipo da SD poderia ser consequência da duplicação de apenas uma parte da banda 21q22 do cromossomo 21, que por si só, representa quase metade do braço longo deste cromossomo (KORENBERG *et al.*, 1992; SINDOOR, 1997).



Figura 1 - Cariótipo de trissomia 21 (sexo feminino), mostrando três cópias do cromossomo humano 21 (ANTONARAKIS *et al.*, 2004).

A SD constitui uma das causas mais frequentes de deficiência mental, compreendendo cerca de 18% do total de deficientes mentais em instituições especializadas (MOREIRA; CHARBEL; GUSMÃO, 2000). Estima-se que a incidência de SD seja de 1/1.000 a 1/1.200 nascidos vivos (WHO, 2007). De acordo com Werneck (1995), em nosso país nascem, por ano, cerca de oito mil crianças com SD. A frequência efetiva de concepções de embriões SD pode ser ainda mais elevada, uma vez que foi estimado que apenas 1/3 de embriões com trissomia chegam ao fim da gestação, 2/3 sendo abortados espontaneamente (MIKKELSEN, 1981).

Há uma direta relação entre o aumento da idade materna e a elevação dos riscos de nascimento de crianças com a síndrome. Para uma mulher de 35 a 39 anos, o risco de ter um filho com SD é 6,5 vezes

maior do que para uma mulher de 20 a 24 anos. Para uma mulher de 40 a 44 anos, o risco é 20,5 vezes maior (BERKOWITZ, 2000). A correlação com a idade materna sugere que, na maioria dos casos, a não disjunção meiótica do cromossomo 21 ocorre no ovócito (COTRAN; ROBBINS; KUMAR, 1994). As tendências sociais e eventos ambientais tendem a aumentar ainda mais a frequência de ocorrência da SD, que está associada com a idade avançada dos pais, principalmente da mãe (POLANI *et al.*, 1976; STENE *et al.*, 1977). Dentre essas tendências está o crescimento de concepções atrasadas devido à instabilidade dos casamentos e a tendência atual das mulheres de estabelecer a sua carreira profissional antes da concepção (MIKKELSEN, 1981; WAGENBICHLER, 1981). Assim, mais de um século após a sua descrição, a SD ainda é, e torna-se cada vez mais, uma condição que merece atenção.

Apesar de todos os problemas causados pela síndrome, a expectativa de vida de pessoas com SD tem aumentado substancialmente. Nos Estados Unidos (EUA) em 1959, a expectativa de vida para estes indivíduos era de 9 anos de idade, hoje em dia, é comum para um portador desta síndrome viver até os 50 anos ou mais (NHI, 2007). Aproximadamente 80% sobrevivem até os 30 anos (COTRAN; ROBBINS; KUMAR, 1994) e um em cada sete atinge os 68 anos de idade (THOMPSON; THOMPSON, 2001). Um estudo populacional feito nos EUA demonstrou que a mortalidade entre os afetados é significativamente menor em negros e outras raças, em detrimento da raça branca. As causas mais frequentes de óbito foram principalmente doenças cardíacas congênitas, seguidas de pneumonias, outras infecções e leucemia (YANG; RASMUSSEN; FRIEDMAN, 2002).

O diagnóstico definitivo da SD é feito por análise cromossômica, o que pode ser iniciado antes do nascimento, devido a fatores de risco identificados, ou após o nascimento devido à aparência característica da criança. A detecção precoce das malformações permite o suporte médico adequado para o nascimento e acompanhamento da criança. Além disso, permite que seja dado aos casais preparo psicológico, orientações sobre conduta na gestação e no parto, bem como cuidados pós-natais. Existem vários métodos passíveis de se detectar a SD precocemente através dos exames que fazem parte do diagnóstico pré-natal (NUSSBAUM; MCLNNES; WILLARD, 2002; ROIZEN; PATTERSON, 2003).

A investigação da SD se baseia na idade materna e em exames invasivos e não invasivos. Os procedimentos invasivos como cordoncentese, amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas, são utilizados para testes confirmatórios, os quais se baseiam em análises

bioquímicas, cariótipo fetal ou técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando as células fetais coletadas. A indicação de testes invasivos ocorre quando o risco do feto apresentar SD for no mínimo igual ao risco da perda fetal devido ao procedimento (VERMA, 1998; THOMPSON; THOMPSON, 2001; ROIZEN; PATTERSON, 2003).

Dentre os métodos não invasivos de diagnóstico pré-natal estão os testes de triagem: a translucência nuchal, o teste triplo (alfa-fetoproteína, gonadotrofina coriônica e estradiol não conjugado) e a ultrassonografia fetal (DURIC *et al.*, 2003; GETZ; KIRKENGEN, 2003; HUNG *et al.*, 2003). O teste triplo realizado no soro da gestante no primeiro trimestre tem uma taxa de detecção de 69% e uma taxa de 5% de falsos positivos. O uso combinado de triagem no soro materno com os testes de ultrassom fetal para translucência nuchal pode ter uma taxa de detecção de 80-85%, com uma taxa de 5% de falso-positivos (ROIZEN; PATTERSON, 2003). Para confirmação do diagnóstico de trissomia 21 deve ser realizada análise total do cariótipo a partir da cultura de células fetais (MANN *et al.*, 2001).

Os cuidados com os indivíduos com SD transcendem a área médica. A Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) e outras instituições de auxílio a famílias dos portadores desta síndrome têm desenvolvido trabalhos multidisciplinares com médicos, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, psicólogos, terapeutas ocupacionais, dentre outros, que desempenham planos terapêuticos por longo período de tempo. Também acompanham os pais dessas crianças, através de apoio psicoterapêutico e esclarecimentos contínuos (VALLE *et al.*, 2001).

2.1.2. Etiologia e Base Genética

Já faz mais de 50 anos desde que a trissomia 21 foi identificada como a causa da SD, proporcionando a primeira ligação entre um distúrbio clínico e uma anomalia cromossômica (NAGAOKA; HASSOLD; HUNT, 2012). Assim, a SD é considerada uma cromossomopatia, ou seja, uma doença cujo quadro clínico global é explicado por um desequilíbrio na constituição cromossômica, no caso, a presença de um cromossomo 21 extra, caracterizando, assim, uma trissomia simples (SILVA; DESSEN, 2002).

Esta condição genética trata-se de uma aneuploidia, por apresentar um número anormal de cópias de uma região genômica, sendo uma causa comum de doenças genéticas em humanos. Classicamente, o termo aneuploidia está relacionado à presença de

cópias extras de cromossomos inteiros (trissomia), ou ausência de cromossomos (monossomia), mas esta definição pode ser estendida incluindo as deleções ou duplicações de regiões subcromossomal (ANTONARAKIS *et al.*, 2004). Desde 1959, quando foi comprovada a existência de um cromossomo extra na constituição cromossômica dos indivíduos com SD, várias descobertas foram feitas em relação ao seu quadro clínico. Embora, os fatores etiológicos das características inerentes à SD ainda não estejam totalmente esclarecidos, pesquisas continuam buscando desvendar sua base genética (SILVA; DESSEN, 2002).

É possível verificar diferentes formas para a ocorrência dessa anormalidade genética como: a Trissomia Livre do cromossomo 21, Translocações, Mosaicismo ou, ainda, a Trissomia Parcial do cromossomo 21. A Trissomia livre do cromossomo 21 é o mecanismo mais comum de formação da SD. Ocorre em aproximadamente 95% dos casos, decorrente da não disjunção meiótica. Assim, os indivíduos SD têm um cromossomo 21 extra, ou seja, apresentam 47 cromossomos ao invés de 46 (SMITH, 1988; REGEZI; SCIUBBA, 1989; THOMPSON; THOMPSON, 2001). O cromossomo extra, deriva entre 80 a 93% dos casos da mãe e é em 77,5% devido a uma segregação anormal dos cromossomos durante a meiose I. Dessa forma, tanto o gameta feminino quanto o masculino têm 23 cromossomos, e geram um zigoto com 46 cromossomos. Contudo, como resultado de uma primeira divisão celular defeituosa (uma não disjunção), são geradas duas células, uma com 45 cromossomos (apenas um cromossomo 21) e outra com 47 cromossomos (três cromossomos 21). A célula com 45 cromossomos não sobrevive e a com 47 cromossomos segue dividindo e resulta em um indivíduo com genótipo 47 XX ou XY, +21 (ANTONARAKIS, 1998).

Os outros 5% dos casos de portadores de Trissomia 21 são explicados por outras anormalidades cromossômicas, incluindo translocações dos tipos Robertsonianas (3%), na qual o material cromossômico extra é derivado da presença de uma translocação do braço longo do cromossomo 21 para outro cromossomo acrocêntrico, como o cromossomo 13, 14, 15, 21 ou 22. A SD por translocação não exibe relação com a idade materna, mas o risco de recorrência é maior quando um dos pais, especialmente a mãe, é portadora da translocação. Em aproximadamente 2% dos casos, ocorre mosaicismo, no qual algumas células exibem trissomia 21, mas outras têm um cariótipo normal. A Trissomia parcial do 21 é ainda mais rara. Acontece quando a SD se manifesta em um indivíduo que apresenta apenas uma parte do braço longo do cromossomo 21 em triplicata. Porém, estes indivíduos

são de particular interesse porque podem mostrar qual região do cromossomo 21 é provável de ser responsável por comportamentos específicos do fenótipo da SD (zona crítica), e qual a região pode ser triplicada sem causar os aspectos típicos do fenótipo (GRIFFITHS, 1998; THOMPSON; THOMPSON, 2001).

O cromossomo 21 representa cerca de 1-1,5% do genoma humano. É o menor autossomo, possuindo cerca de 33,8 milhões de pares de bases (pb) de DNA. Desde a associação da trissomia 21 com a SD, cerca de 20 loci foram mapeados no braço longo deste cromossomo e a estrutura e conteúdo dos seus genes têm sido intensamente investigados. O tamanho do braço longo do cromossomo (21q) foi estimado em cerca de 38 megabases (Mb). Foram sequenciados 33.546.361 pb de DNA, distribuídos em 4 áreas de genes contíguos, com uma acurácia muito grande. A maior destas áreas de genes contíguos possui 25.491.867 pb em sua extensão. Conseguiu-se uma cobertura de 99,7% do braço longo do cromossomo 21, em adição 281.116 pb do braço curto foram também sequenciadas. Com o sequenciamento do cromossomo 21, foi dado um passo importante para elucidar as bases genéticas da SD. Sua análise revelou 127 genes conhecidos, 98 genes preditos e 59 pseudogenes (ANTONARAKIS, 1998; HATTORI *et al.*, 2000; ANTONARAKIS *et al.*, 2004).

Considerando que a translocação cromossômica responsável pela SD envolve o braço longo do cromossomo 21 (21q), é provável que nele estejam presentes os genes que, quando triplicados, expressem características da SD, não havendo, portanto, a necessidade de uma trissomia completa do cromossomo 21 para o desenvolvimento do fenótipo Down (VIGO, 1997). O segmento 21q22.2 é referido como região crítica para a SD (DSCR). Nele é estimado que estejam presentes apenas 20 a 50 genes dos 225 descritos no braço longo do cromossomo 21, os quais estão relacionados ao fenótipo da síndrome. A esta região podem ser incluídos elementos das bandas 21q22.1 e 21q22.3 (KORENBERG *et al.*, 1990). As características dismórficas e a patogênese de anormalidades neurológicas, imunológicas, endócrinas e bioquímicas que são características da SD são decorrentes do metabolismo desbalanceado nestes indivíduos devido à síntese excessiva de múltiplos produtos derivados da expressão elevada de genes presentes no cromossomo 21 (LESHIN, 2000; POGRIBNA *et al.*, 2001).

O cromossomo 21 é composto de duas categorias de genes, aqueles que são sensíveis à dosagem - isto é, uma cópia extra, resulta em efeitos fenotípicos - os quais contribuem para o fenótipo da SD, e

aqueles que não são sensíveis à dosagem e, por conseguinte, não contribuem para nenhum fenótipo. O efeito de alguns genes sensíveis à dosagem sobre os fenótipos podem ser alelo específico. De acordo com esta hipótese, certas combinações de alelos podem contribuir para o fenótipo, enquanto outras podem ser silenciosas. O efeito da combinação de alelos pode ser qualitativo (alelos com variação de aminoácidos) ou quantitativo (alelos com variação no nível de expressão de genes) (ANTONARAKIS *et al.*, 2004). Korenberg e colaboradores (1994) demonstraram através de portadores de trissomia parcial do cromossomo 21, que alguns genes ou conjunto de genes estão relacionados à manifestação de determinadas características da síndrome. A observação desta correlação possibilitou a construção de um mapa fenotípico o qual contribuiu para a compreensão das bases moleculares da SD.

Apesar de sua importância na SD, a trissomia no cromossomo 21 não responde por todas as características fenotípicas encontradas na síndrome, e não é capaz de, por si só, quantificá-las. Acredita-se que a partir da trissomia, ocorra um desequilíbrio na homeostasia dos genes, afetando não só os produtos do cromossomo 21, como também os dos outros cromossomos. Aliados aos fatores genéticos, fatores epigenéticos (como interações celulares, causas ambientais e fatores estocásticos) também são responsáveis pelo fenótipo de indivíduos com SD. Por isso, pessoas com SD mostram-se fenotipicamente tão desiguais, com diferenças nos seus potenciais cognitivos e nas suas suscetibilidades a patologias (MATOS *et al.*, 2007).

2.1.3. Aspectos clínicos

A SD apresenta uma combinação particular de características fenotípicas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. As manifestações clínicas da SD costumam ser prontamente evidentes, mesmo ao nascimento. O comprometimento intelectual é uma característica observada em todos os casos e os aspectos clínicos mais frequentes incluem um perfil facial achatado (80%), microcefalia (85%), fissuras palpebrais oblíquas (90%) e pregas epicânticas (40%), braquicefalia, blefarofimose, cabelos lisos e finos, pescoço curto e grosso com pele frouxa excessiva, ponte nasal plana, orelhas pequenas e de baixa implantação (50%), borda superior da orelha (*hélix*) é muitas vezes dobrada, canais dos ouvidos estreitos, olhos com manchas de Brushfield ao redor da margem da íris, palato e mandíbula pequenos resultando em boca aberta mostrando língua sulcada e saliente, alguns

dentes podem ter formato diferente ou ser ausentes, baixa estatura (60%), hipotonia muscular (99%), hiperextensibilidade das articulações (80%), mãos largas e dedos curtos (70%) com sulco palmar único ou “prega simiesca” (40%), clinodactilia do quinto dedo (50%), pés com amplo espaço entre o primeiro e o segundo podáctilos, dermatóglifos altamente típicos, displasia da pelve, instabilidade atlanto-axial (15%) e instabilidade rótulo-femural (10%) (DOWN, 1866; COTRAN; ROBBINS; KUMAR, 1994; MUSTACCHI; PERES, 2000; THOMPSON; THOMPSON, 2001; SILVA; DESSEN, 2002; YANG; RASMUSSEN; FRIEDMAN, 2002;).

A SD é a causa mais comum de retardo mental leve a moderado (YANG; RASMUSSEN; FRIEDMAN, 2002). Deficiência mental é geralmente definida por uma pontuação de QI (quociente de inteligência) inferior a 70. Estima-se que das crianças afetadas com a SD, 10% têm deficiência intelectual grave (QI inferior a 20), 70% moderada (QI entre 20 e 50) e 20% leve (QI entre 50 e 70) (ALBERMAN; NICHOLSON; WALD, 1992).

Além das anormalidades fenotípicas e do comprometimento intelectual, já mencionados, essas pessoas podem apresentar complicações que podem ser congênitas ou surgir durante as diversas fases de seu desenvolvimento. Em média, 40% a 60% das crianças com a síndrome apresentam cardiopatias congênitas. As lesões mais frequentes são o defeito do septo atrioventricular, presente em 45% dos recém-nascidos com SD, e defeito do septo ventricular (35%). Tetralogia de Fallot (4%) e outras lesões também podem ser encontradas isoladamente nos portadores desta síndrome. Os sintomas de doença cardíaca grave podem ser ausentes ou ocultos, devido à tendência de crianças com SD desenvolverem resistência vascular pulmonar. Adolescentes e jovens adultos sem doença cardíaca conhecida podem apresentar prolapso da válvula mitral (46%) e regurgitação aórtica (17%) (GRANZOTTI *et al.*, 1995; FREEMAN *et al.*, 1998; de RUBENS *et al.*, 2003). Malformações no trato gastrointestinal, como estenose duodenal, ocorrem com menor frequência (LEVY, 1991). Observa-se também perda auditiva (38-78%), que pode ser condutiva, sensorial ou mista, e alterações de acuidade visual (15-50%), como erros de refração (35-76%), estrabismo (27-57%), nistagmo (20%), entre outros. Cerca de 15% apresentam disfunção da tireóide, particularmente o hipotireoidismo. Alterações na coluna cervical (1-10%), problemas neurológicos (5-10%), anomalias gengivais e periodontais e hipogonadismo, além de obesidade e envelhecimento precoce, também são mais frequentes e evidentes em indivíduos com a SD do que na

população geral (COOLEY; GRAHAM, 1991; ROIZEN; PATTERSON, 2003).

As crianças com SD têm risco 10-20 vezes maior de desenvolver desordens hematológicas quando comparadas com crianças não-Down. Dentre elas estão policitemia em recém-nascidos (64%), macrocitose (66%), Desordem Mieloproliferativa Transitória, Leucemia Mielóide Aguda (LMA), e Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (ROIZEN; AMAROSE, 1993; KIVIVUORI; RAJANTIE; SIIMES, 1996; LANGE, 2000; MORRISSETTE; HALLIGAN; PUNNETT, 2006). Desordem Mieloproliferativa Transitória é uma forma de leucemia, na maioria dos casos, autolimitada e, por razões desconhecidas, regride espontaneamente com a idade de 2-3 meses. Ela surge quase exclusivamente em recém-nascidos com SD e ocorre em quase 10% deles. No entanto, em algumas vezes, a leucemia transitória pode se manifestar de forma mais severa, cursando com o estabelecimento de fibrose hepática e falência cardiopulmonar (FONG; BRODEUR, 1987; LANGE, 2000).

Acredita-se que de 8-15% da população mundial com mais de 65 anos sejam acometidas pela Doença de Alzheimer (DA). Em estudo realizado em portadores da SD institucionalizados verificou-se a prevalência de demência em 55% das pessoas com idade entre 35 e 49 anos e em 75% com idade acima dos 60 anos (FRIDMAN, 2004; MENENDEZ, 2005). Após a idade de 35 anos, muitos desenvolvem alterações neuropáticas análogas às encontradas na DA (WILSON, 1994).

A relação entre a SD e DA pode ser explicada pela presença de genes localizados no cromossomo 21. Diversos genes estão implicados na associação entre SD e DA, no entanto, um ponto-chave dessa associação é a superexpressão do gene precursor da proteína β -amilóide (PPA), localizado na região crítica da SD, no cromossoma 21 e que contém a região codificadora da proteína β -amilóide. No cérebro de um paciente com SD, a proteína amilóide começa a depositar-se cerca de 50 anos antes do que em uma pessoa não portadora desta síndrome que desenvolve DA. O grau de retardo mental é importante fator de risco para uma pessoa com SD desenvolver DA. Além disso, estudos mais recentes indicam que a diminuição do fator de crescimento neural e da quantidade de neurônios colinérgicos, também esteja implicada na patogênese da DA em portadores de SD (ELROY-STEIN; GRONER, 1988; ISACSON *et al.*, 2002).

Os portadores desta síndrome apresentam microcefalia, decréscimo do peso total do cérebro e cerebelo menor que o normal,

além disso, são documentadas deficiências específicas em áreas que envolvem habilidades auditivas, visuais, de memória e de linguagem. A fala pode começar a desenvolver-se somente após os 3 anos de idade. Isso está relacionado à deficiência mental, problemas de audição, afasia, salivação excessiva, fechamento oral inadequado, língua relativamente grande em uma pequena cavidade oral, anomalias dentárias e hipotonia muscular. O desenvolvimento motor da criança com SD é lento e tardio resultando em coordenação motora restrita (WILSON, 1994; JONES, 1998).

A frequência de crises epiléticas e autismo em pessoas com SD é maior do que em pessoas não síndrômicas, porém, o número de indivíduos com SD epiléticos é menor do que pessoas com retardo mental de qualquer outra etiologia. A incidência de portadores desta síndrome que desenvolvem autismo ou epilepsia é de aproximadamente 5-10% (WINDHAM; BJERKEDAL; LANGMARK, 1985).

Outro aspecto clínico importante da SD é o risco aumentado de apresentar anormalidades do trato gastrointestinal (TGI) como, obstrução do TGI superior, fístula traqueo-esofágica e estenose pilórica. Episódios de constipação ocorrem frequentemente nestes indivíduos, e podem ter relação com a diminuição da tonicidade muscular e da atividade motora generalizada, além do hipotireoidismo e Doença de Hirschsprung, característicos dos portadores desta síndrome (ZARATE *et al.*, 2001; AL-KASIM *et al.*, 2002).

O hipotireoidismo é a doença da tireóide mais comum em indivíduos com SD. Sua incidência é maior em indivíduos Down do que na população em geral, para todas as faixas etárias. Os sinais clínicos do hipotireoidismo são semelhantes à algumas características normais da SD, como atraso do crescimento, constipação, entre outras, e por este motivo podem ser “mascarados” em portadores desta síndrome. Por esta razão é recomendado realizar dosagens hormonais para hipotireoidismo periodicamente nestes indivíduos (LESHIN, 2000; BLEHAU *et al.*, 2010).

As características típicas de portadores da SD tem como consequência outro distúrbio, a apnéia obstrutiva do sono, a qual é observada em 45% das crianças com SD. Dentre as características do fenótipo Down que contribuem para essa percentagem, estão perfil facial achatado, nasofaringe estreita, tônus reduzido da musculatura das vias aéreas superiores e aumento das adenoides ou amígdalas (HASLE; KEERNDRUP; JACOBSEN, 1995; LESHIN, 2000).

Estudos recentes indicam que indivíduos com SD têm risco maior de desenvolver doença celíaca (7-16%) e diabetes *mellitus* tipo 1 (1,4-

10,6%) em relação às pessoas geneticamente normais, por se tratarem de doenças auto-imunes (LESHIN, 2000). Além disso, os portadores desta síndrome apresentam também maior susceptibilidade a infecções, principalmente cutâneas, mucosas, gastrointestinais e respiratórias. Isso pode estar relacionado à presença de linfopenia, eosinopenia, defeito nos neutrófilos, no padrão de imunoglobulinas do soro e na imunidade mediada por células (SCULLY, 1976; WINDHAM; BJERKEDAL; LANGMARK, 1985).

O desenvolvimento das características sexuais secundárias na SD é similar a de outros adolescentes. A ovogênese fetal das mulheres com a síndrome parece ser normal e, portanto, elas possuem capacidade de reprodução. Por outro lado, os homens têm a capacidade reprodutiva diminuída, mostrando histologia testicular compatível com oligospermia. Além disso, o hipogonadismo é uma das características frequentemente observadas nesses indivíduos (GOLDSTEIN, 1988; MERCER *et al.*, 2004).

Distúrbios bioquímicos afetam vários aspectos do metabolismo da SD (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988). Uma das primeiras descobertas sobre as perturbações metabólicas nestes indivíduos foi a excreção reduzida de alguns componentes da urina. Uma diminuição considerável nos níveis de triptofano e aumento do ácido úrico sérico também são observados nesta síndrome. Os distúrbios no metabolismo do triptofano são de grande importância, uma vez que a deficiência de serotonina pode ser responsável por uma diminuição do tônus do músculo liso, vasos sanguíneos e vias respiratórias (CHAPMAN; STERN, 1964; AIRAKSINEN; KAUKO, 1973). Diminuições na atividade da acetilcolinesterase e do teor de albumina foram encontradas no plasma de portadores da SD. Outros distúrbios na composição proteica do sangue destes indivíduos incluem diminuição da alfa-1 e alfa-2 globulinas e aumento da gamaglobulina, alfa-2-macroglobulina e imunoglobulina A (KEDZIORA; WACHOWICZ, 1974; KEDZIORA *et al.*, 1980).

A atividade de uma série de enzimas de células sanguíneas, não ligadas ao cromossomo 21, está aumentada na SD, o que resulta em mais perturbações metabólicas. Dentre as enzimas com atividade aumentada estão a glicose-6-fosfato desidrogenase (aumentada 3 vezes), fosfohexoquinase, galactosequinase e fosfofrutoquinase (aumento de 50%) nos eritrócitos e glicose-6-fosfato desidrogenase, fosfatase ácida e fosfatase alcalina apresentam-se elevadas nos leucócitos. Isso pode envolver um menor tempo de vida e média de idade das células circulantes e/ou seu padrão de envelhecimento alterado (KEDZIORA;

BARTOSZ, 1988). Indivíduos com SD apresentam um conjunto de anormalidades na membrana dos eritrócitos, tais como permeabilidade alterada e aparência típica de eritrócitos velhos e danificados (KEDZIORA *et al.*, 1982).

Uma criança afetada por essa trissomia não apresenta, necessariamente, todas essas características, e alguns desses fenótipos podem ser encontrados em indivíduos não afetados.

2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo (MÉNDEZ; RODRÍGUEZ, 1997). O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Esta condição pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A geração de radicais livres pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu sítio de formação (ANDERSON, 2000). As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (MÉNDEZ; RODRÍGUEZ, 1997).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS *et al.*, 2007). As EROs são geradas principalmente através de produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, pela redução incompleta do oxigênio à água, constituindo a classe mais importante de espécies radicalares geradas em organismos aeróbios. Esta terminologia é usada para incluir não só as espécies radicalares, mas também as espécies que não possuem elétrons desemparelhados, mas que são reativas devido à sua instabilidade, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (INOUE *et al.*, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; VALKO *et al.*, 2007). O oxigênio singlete (1O_2) é um estado eletrônico excitado do oxigênio

molecular, que também possui capacidade oxidante e está envolvido principalmente nas reações de fotossensibilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As EROs são produzidas também por outras vias, como por exemplo, explosão respiratória que ocorre em fagócitos ativados, o efeito prejudicial da radiação ionizante sobre os componentes das membranas celulares, e como subprodutos de várias enzimas celulares incluindo NADPH oxidases, xantina oxidase e óxido nítrico sintase endotelial (ALFADDA; SALLAM, 2012).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta. Cerca de 2% a 5% dos elétrons que participam das reações de transferência, escapam dos complexos mitocondriais e acabam reagindo com o oxigênio molecular sendo reduzidos de forma univalente, constituindo a principal fonte de EROs (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A redução univalente do O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). O $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer dismutação espontânea ou mediada pela enzima superóxido dismutase (SOD) produzindo H_2O_2 (JENSEN, 2003). Além dos sítios que formam o $O_2^{\bullet-}$, os peroxissomas são grande fonte de produção de H_2O_2 (VALKO *et al.*, 2007). A quebra das ligações do H_2O_2 entre os átomos de oxigênio forma o radical hidroxil (HO^{\bullet}), catalisado por metais de transição (reação de Fenton), ou pela combinação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (reação de Haber Weiss) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Por participar da reação de geração de HO^{\bullet} , o H_2O_2 tem ação deletéria potencial, uma vez que o HO^{\bullet} consiste no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre no seu raio atômico. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 apresenta uma meia-vida longa e um alto poder de difusão em grandes distâncias celulares antes de sofrer uma reação. É capaz de atravessar as membranas celulares, apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro, via Reação de Fenton (EATON, 1991; JENSEN, 2003).

O HO^{\bullet} é o radical livre de oxigênio com a maior reatividade e de menor tempo de meia-vida (10^{-12} s) e apresenta uma alta atividade de reação com os constituintes celulares, oxidando resíduos de

aminoácidos, alterando forma e funcionalidade de proteínas e enzimas, podendo também levar a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas, promovendo mutações ou até ruptura na fita de DNA. Durante a ativação inflamatória a enzima mieloperoxidase, converte o H_2O_2 e cloreto em ácido hipocloroso (HClO^\bullet), sendo que essa espécie também em combinação com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ dá origem ao HO^\bullet (CANDEIAS *et al.* 1993; WINTERBOURN; KETTLE, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A reação das EROs com macromoléculas celulares resulta em peroxidação lipídica e lesões de membrana, inativação enzimática, mutagênese e carcinogênese (MORENO *et al.*, 1980). A peroxidação lipídica é um conjunto de reações de EROs em cadeia que causam degeneração das membranas celulares (KAPPUS; DIPLOCK, 1992). Os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que essas sejam potentes geradoras de radicais livres, alcóxil (RO^\bullet) e peróxil (ROO^\bullet), por meio da lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Existem outras formas de EROs envolvidas no dano celular formadas nas reações de propagação, como os radicais peróxil (ROO^\bullet) e alcóxil (RO^\bullet), além de espécies reativas derivadas do nitrogênio. Além da capacidade do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em participar de reações de geração de HO^\bullet , pode ainda reagir com o radical livre óxido nítrico gerando, assim, a espécie mais reativa de nitrogênio, o peroxinitrito (ONOO^\bullet) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; NAVILIAT *et al.*, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). O óxido nítrico ($^\bullet\text{NO}$) é um importante sinalizador celular que participa de uma variedade de processos fisiológicos, tais como: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão e regulação imune. Além disso, essa molécula também possui um elétron não pareado em seu orbital mais externo, constituindo uma espécie radicalar. Assim sendo, o $^\bullet\text{NO}$ é o principal representante e precursor de compostos coletivamente denominados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O peroxinitrito (ONOO^\bullet), apesar de não ser um radical, por não apresentar elétrons desemparelhados, é a ERN mais reativa e altamente difusível, sendo formado através da reação do $^\bullet\text{NO}$ com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, promovendo dano através de oxidação e nitração de ácido nucléicos, proteínas e lipídios, apresentando assim potencial patogênico em diversas doenças inflamatórias (NAVILIAT *et al.*, 2005; SAWA; OHSHIMA, 2006).

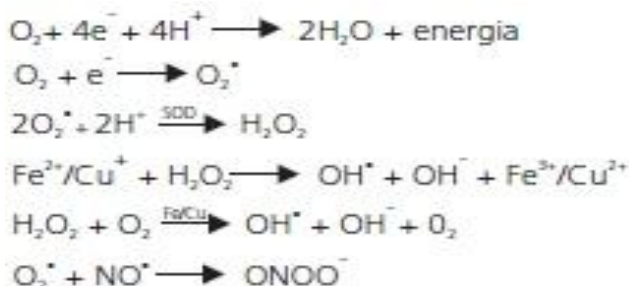


Figura 2 - Formação mitocondrial de EROs e ERNs (Adaptado: BARBOSA *et al.*, 2010).

2.3. DEFESAS ANTIOXIDANTES

EROs são continuamente formadas durante os processos metabólicos normais do organismo. A fim de manter a homeostase, todas as células possuem mecanismos de defesa para limitar os níveis intracelulares de espécies reativas e controlar a ocorrência de danos relacionados a elas. Isto é feito por meio de um intrincado sistema antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; ALFADDA; SALLAM, 2012).

As substâncias para serem consideradas antioxidantes devem ser capazes de evitar ou prevenir a oxidação de substratos oxidáveis, mesmo em concentrações relativamente baixas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Os mecanismos deste sistema de defesa atuam contra as espécies reativas, radicalares e não-radicalares, inicialmente por meio da prevenção, protegendo contra a formação das substâncias agressoras. Na sequência ocorre a interceptação impedindo a ação das espécies reativas, que escaparam a primeira linha de defesa, as quais, uma vez formadas, iniciam suas atividades destrutivas. Existe ainda, um sistema de reparo que atua quando a prevenção e a interceptação não foram completamente efetivas e os produtos da destruição pelos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e desta forma podem se acumular no organismo (SANTOS; CRUZ, 2001). O sistema de defesa antioxidante costuma ser dividido em enzimático e não enzimático (endógenos ou nutricionais) (CADENAS, 1997).

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas estão incluídas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutatona peroxidase (GPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs (BOVERIS; CADENAS, 1997). O

controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a manutenção da integridade celular e sobrevivência no ambiente aeróbico (FERRARI *et al.*, 1985; PAL YU, 1994; PINTO *et al.*, 2002).

A enzima superóxido dismutase (SOD) promove a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 , conferindo proteção celular contra essa espécie reativa, constituindo umas das mais importantes e primeiras linhas de defesa antioxidante do organismo (McCORD; FRIDOVICH, 1969). A decomposição do $O_2^{\bullet-}$ ocorre naturalmente, porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$, de forma que há necessidade de maior concentração do $O_2^{\bullet-}$. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a eliminação do $O_2^{\bullet-}$ mesmo em baixas concentrações (BOVERIS; CHANCE, 1973; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). A SOD compreende uma família de enzimas composta das isoformas mitocondrial (Cu/Zn-SOD), citosólica (Mn-SOD) e extracelular (EC-SOD) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

Por conseguinte, a CAT, enzima localizada principalmente nos peroxissomas da célula, é responsável pela detoxificação específica de H_2O_2 em água e oxigênio (BOVERIS; CHANCE, 1973; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). A GPx, da mesma forma que a CAT, atua removendo H_2O_2 e formando água por meio da conversão da glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG). Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de H_2O_2 para que não haja produção de HO^{\bullet} , contra o qual não existe sistema enzimático de defesa. Além do H_2O_2 , a glutathiona peroxidase (GPx) metaboliza outros hidroperóxidos orgânicos que também podem servir como substrato para a reação de Fenton, além de fosfolipídios, hidroperóxidos, inibindo a reação de peroxidação lipídica em membranas celulares (FERRARI *et al.*, 1985; PAL YU, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; VALKO *et al.*, 2006). Além destas defesas, as células apresentam ainda enzimas coadjuvantes e importantes na ação antioxidante como a glutathiona redutase (GR) e o conjunto das glutathiona S-transferases. A enzima glutathiona redutase (GR) é a enzima responsável pelo mecanismo de redução da glutathiona oxidada (GSSG) à glutathiona reduzida (GSH) regenerando a glutathiona reduzida (GSH) e promovendo, assim, a manutenção de elevadas concentrações da razão GSH/GSSG nas células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As glutathiona S-transferases (GSTs), embora não atuem diretamente contra as EROs, constituem

outra importante defesa celular, pois estão associadas à detoxificação e excreção de hidroperóxidos, bem como à biotransformação de xenobiontes, como herbicidas, inseticidas e outros agentes carcinogênicos, isto é, fontes potenciais de EROs. Atuam conjugando glutatona reduzida (GSH) a esses compostos, conferindo menor reatividade e maior solubilidade para sua excreção renal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

As células possuem moléculas conhecidas como antioxidantes não enzimáticos, classe esta onde estão incluídos compostos endógenos e exógenos ou nutricionais. O sistema antioxidante não enzimático é capaz de prevenir o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com as espécies reativas de oxigênio (SANTOS; CRUZ, 2001).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos produzidos *in vivo* endógenos estão a glutatona reduzida (GSH), o ácido úrico, bilirrubina, hormônios sexuais, hormônio melatonina, ácido lipóico, α -cetoácidos e coenzima Q10 (SCANDALIOS, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A GSH, o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos e demais organismos aeróbios, é o antioxidante não enzimático mais importante envolvido na defesa celular contra espécies reativas. Possui a capacidade de captar EROs via auto-oxidação e pode ser encontrado em concentrações elevadas em todos os tecidos que usam o metabolismo oxidativo, compartimentos celulares e sub-celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; WILHELM FILHO *et al.*, 2000). A relação GSH/GSSG é um determinante crítico para as células, sendo que isso torna a GSH um indicador sensível de função e viabilidade celular. Além de atuar diretamente contra espécies químicas reativas, também é o substrato de enzimas antioxidantes como a GPx e GST (PASTORE *et al.*, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Os antioxidantes não enzimáticos do tipo exógenos ou nutricionais incluem a vitamina E, C e A, além de carotenóides como o licopeno e o β -caroteno, flavonóides e outras pequenas moléculas derivadas de fontes vegetais (SCANDALIOS, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

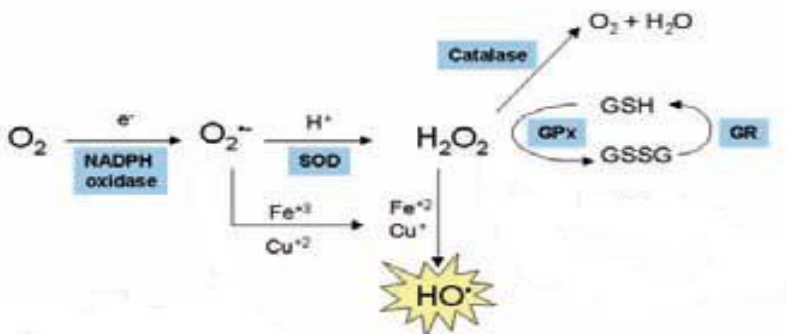


Figura 3 – Reações e respectivas enzimas envolvidas na formação de EROs. Sistema de defesa antioxidante enzimática de organismos aeróbios (Adaptado: BARBOSA et al., 2006).

2.4. ESTRESSE OXIDATIVO

O desequilíbrio entre as moléculas e mecanismos pró-oxidantes e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, com predomínio daquelas pró-oxidantes, resulta em uma variedade de mudanças fisiológicas e indução de danos celulares, chamados coletivamente de Estresse Oxidativo (EO) (SIES, 1985).

Tais danos estão relacionados ao potencial das EROs e ERNs em oxidar os constituintes celulares, incluindo DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos, os quais levam à deterioração da estrutura e função celular. Portanto, o EO pode estar envolvido em processos tais como mutagênese, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos de carboidratos e pode ser consequência da depleção dos níveis de antioxidantes, e/ou do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para os processos de envelhecimento e doenças (WEN; GARG, 2004; MARQUES; MARREIRO, 2006). A cronicidade do processo de oxidação de biomoléculas tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos, como Alzheimer, câncer, inflamações crônicas, cardiopatias entre outras (SIES; STAHL, 1997; NORDBERGER; ARNÈ, 2001; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003; GREEN; BRAND; MURPHY,

2004; SORG, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Mesmo em condições fisiológicas as EROs causam danos às biomoléculas, (EVANS; COOKE, 2004) o que se acentua em condições de EO (SIES, 1985). No entanto, enquanto lipídios, proteínas e carboidratos podem ser removidos via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA, em função das informações genéticas das células. O acúmulo de lesões no DNA pode levar a consequências sérias para a célula, relacionadas à mutagênese e carcinogênese (MOREL *et al.*, 2001).

2.4.1. Dano ao DNA

São inúmeras as alterações que podem ser causadas pela reação entre as bases do DNA e as EROs, especialmente pelo HO^\bullet , que é conhecido por reagir prontamente com todos os componentes da molécula de DNA causando alterações tanto nas bases nitrogenadas púricas e pirimídicas, quanto na fita de desoxirribose, podendo ocasionar defeitos no processo de replicação de DNA, levando a mutações e erros de transcrição (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Isto pode ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos ou da formação de quebras em uma ou nas duas cadeias de DNA. Essas alterações permanentes no material genético resultante de dano oxidativo, representam o primeiro passo envolvido em mutagênese, carcinogênese e processo de envelhecimento. Um bom exemplo desta interação é a reação entre o $^\bullet\text{OH}$ com a guanina, que dá origem ao aducto 8-hidroxi-guanosina, que é usada como um indicador de dano oxidativo ao DNA e carcinogênese (ZACKS *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006). No caso de o dano exceder a capacidade de reparo ao DNA, as lesões podem culminar na morte celular ou em mutações no genoma (COSTA *et al.*, 2003; EVANS; COOKE, 2004).

2.4.2. Dano proteico

As proteínas podem sofrer diferentes tipos de modificações covalentes devido ao processo de oxidação que pode ser induzido pelo ataque direto de EROs e ERNs, ou indiretamente pela reação de produtos secundários do EO (ZACKS *et al.*, 2005). A exposição das proteínas às espécies reativas, principalmente os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e HO^\bullet , pode ocorrer através de vários mecanismos, tais como oxidação do sítio catalítico e de aminoácidos, oxidação induzindo a quebra da cadeia polipeptídica e conjugação de produtos de peroxidação lipídica. Como

consequência, múltiplas modificações podem ser observadas nas proteínas expostas, dentre elas a oxidação dos grupos das cadeias laterais de aminoácidos, sendo que o HO• ataca preferencialmente os resíduos de cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina (BERGER *et al.*, 1999), fragmentação, modificações na hidrofobicidade e na conformação e, formação de novos grupos reativos, como os grupos carbonil. Além disso, este processo pode resultar na perda da estrutura ou inatividade enzimática das proteínas, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. O ataque ocorre por adição do radical ou por abstração de hidrogênio (BERGER *et al.*, 1999; HAWKINS; STADTMAN, 1997; DAVIES, 2001; BERLETT; CECARINI *et al.*, 2007, VALKO *et al.*, 2007).

Como um marcador estável de oxidação proteica a quantificação de PC pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo, o maior produto de oxidação proteica. Os grupamentos carbonil (C=O) são produzidos pela oxidação das cadeias laterais de aminoácidos, sendo a prolina, arginina, lisina e treonina os resíduos de aminoácidos mais susceptíveis a ação de EROs. Podem ser gerados também através da clivagem oxidativa das proteínas, levando à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado. Do mesmo modo, derivados carbonil reativos (cetoaminas e cetoaldeídos), gerados como consequência da reação de açúcares redutores, podem levar à formação de grupos carbonil (DALLE-DONNE *et al.*, 2003). A principal consequência desse processo é que esse grupamento pode promover ligações intra ou intermolecular e formar agregados proteicos, os quais não podem ser degradados por mecanismos proteolíticos, resultando em acúmulo de proteínas oxidadas com aumento de disfunção celular, afetando processos enzimáticos e de sinalização e estrutura celular (BERLETT; STADTMAN, 1997; CECARINI *et al.*, 2007, VALKO *et al.*, 2007).

2.4.3. Peroxidação Lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura, fluidez e na permeabilidade das membranas celulares, resultando em alterações no transporte iônico, como perda da seletividade, inibição de processos metabólicos, e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos,

culminando com a morte celular (MELLO; HOFFMAN; MENEHINI, 1983; HERSHKO, 1989; NIGAM; SCHEWE, 2000).

O processo de oxidação de lipídios é denominado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (GARDÈS-ALBERT; JORE; FERRADINI, 1991; CATALÁ, 2006). A reação inicia-se com o sequestro de um hidrogênio do grupo metileno do ácido graxo poli-insaturado da membrana celular, pela ação de espécie reativa, com consequente formação de um radical lipídico ($R\bullet$). Os ácidos graxos poli-insaturados caracterizam-se por possuírem múltiplas ligações duplas entre os átomos de carbonos, tornando-se excelentes alvos ao ataque dos radicais livres, principalmente o $HO\bullet$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Na primeira equação de propagação, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxil ($ROO\bullet$), o qual pode abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando um hidroperóxido lipídico ($ROOH$), este, ainda pode sofrer quebra por metais produzindo radicais alcóxil ($RO\bullet$), sendo que ambos os radicais promovem a etapa de propagação, sequestrando hidrogênios de ácidos graxos adjacentes. A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pelo desmembramento dos radicais formados originando aldeídos reativos, com grande capacidade de difusão, como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e 4-hidro-2-hexenal (BORG; SCHAICH, 1988; CATALÁ, 2006 e 2009). O MDA é componente majoritário (~90%), cuja dosagem é realizada através do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). Trata-se de um procedimento amplamente utilizado, sendo o MDA o indicador específico da ocorrência de lipoperoxidação (BIRD; DRAPER, 1984).

2.5. O ESTRESSE OXIDATIVO E A SÍNDROME DE DOWN

Estudos da última década classificam a SD como doença progeróide, sendo o processo de envelhecimento precoce o responsável pelas alterações imunológicas, doenças autoimunes e neoplasias em faixa etária precoce em relação à população geral (RIBEIRO *et al.*, 2003). A SD envolve mais características de envelhecimento acelerado do que qualquer outra doença humana. São indícios deste fato o aparecimento precoce de alterações neuropatológicas semelhantes às da DA, expectativa de vida diminuída, involução tímica, aumento da pigmentação da lipofusina, alterações degenerativas em glândulas

endócrinas, perturbação da função imune, diminuição da capacidade replicativa de fibroblastos em cultura, diminuição do tempo de vida de células vermelhas e, linfócitos circulantes com menor tempo de vida e com idade média mais jovem. Assim, conforme já mencionado anteriormente, entre as mais importantes consequências patológicas da SD estão o retardo mental e envelhecimento acelerado, além de doenças senis secundárias associadas como, por exemplo, imunodeficiência e catarata. Numerosas evidências relacionam ambas as anormalidades a distúrbios no metabolismo do oxigênio (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988; GARCEZ; PERES; SALVADOR, 2005). Portanto, algumas características como envelhecimento precoce, dano cerebral e modificações bioquímicas encontradas na SD são secundárias ao dano oxidativo dentro da célula e podem ser consequência do desequilíbrio genético-bioquímico (AGUILAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003).

O EO é um fator crucial, pois afeta múltiplas vias relacionadas ao crescimento e morte celular, expressão gênica e função de proteínas, entre outros. O EO ocorre muito cedo na patogênese da SD, antes mesmo do aparecimento do fenótipo físico característico e dos prejuízos cognitivos (PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2011).

Estudos sugerem que existe uma região na parte distal do cromossomo 21 (banda 21q22) de cerca de 4 Kb (quilobases), que, se triplicada, está associada a numerosas características da SD. Nesta região, denominada como região crítica da SD, está localizado o gene da SOD1, entre outros (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988; ANTONARAKIS, 1998). O referido segmento cromossômico apresenta, nos indivíduos afetados, as bandas características da eucromatina correspondente a genes estruturais e seus produtos em dose tripla (SHAPIRO, 1983).

Como já mencionado neste trabalho, uma das consequências moleculares mais importantes da trissomia 21 é a presença de uma cópia extra do gene da SOD1, conduzindo a um aumento na atividade desta enzima. Os dados da literatura são consistentes em demonstrar um aumento de aproximadamente 50% na atividade da SOD1 em eritrócitos, plaquetas, leucócitos e fibroblastos, de acordo com um efeito gene dependente de dosagem. A quantidade de imunoproteína SOD1 foi aumentada em 50%, em eritrócitos, leucócitos e linfócitos de indivíduos com trissomia 21. No córtex cerebral de fetos portadores de SD, a atividade desta enzima apresentou-se aumentada em cerca de 60% (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988).

A elevação da atividade da SOD1 na SD é de fundamental importância para a patogênese desta condição genética. Aparentemente,

isto leva a uma perturbação no equilíbrio das EROs no organismo, que por sua vez, provoca alterações metabólicas secundárias. Nas condições de um fluxo metabólico constante de geração de $O_2^{\bullet-}$, a atividade aumentada da SOD1 conduz a uma diminuição nos níveis de $O_2^{\bullet-}$, mas aumenta os níveis endógenos de H_2O_2 . Embora seja mais quimicamente inerte do que o $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 favorece a formação do HO^{\bullet} em reações com complexos ferrosos ou cuproso (reação de Haber-Weiss catalisada por metal) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

As EROs, apesar de serem subprodutos do metabolismo do oxigênio com ação, muitas vezes, deletéria a biomoléculas dos organismos aeróbios, funciona também como intermediários necessários do metabolismo do oxigênio em importantes funções fisiológicas, como regulação da apoptose, diferenciação celular, imunidade e regulação metabólica. Assim, as enzimas chamadas frequentemente de “enzimas protetoras do metabolismo do oxigênio” devem, na verdade, ser encaradas como reguladoras e não puramente de proteção antioxidante, pois controlam o tipo e os níveis de EROs disponíveis. Sendo assim, alterações na atividade da SOD1, incluindo seu aumento, pode levar a distúrbios do metabolismo (FRIED; FRIED; BABIN, 1973).

A SOD1 catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que é degradado pela GPx e CAT. O H_2O_2 produzido em excesso na SD é resultado da atividade SOD1 aumentada sem aumento concomitante e proporcional de mecanismos de defesa complementares, como atividade da GPx e CAT (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Assim, tem sido sugerido por muitos autores que o aumento na atividade das enzimas que detoxificam H_2O_2 (GPx e CAT), seria uma resposta adaptativa ao aumento de geração de H_2O_2 (SINET; LEJUNE; JEROME, 1979), já que os genes que codificam estas enzimas não são encontrados no cromossomo 21.

A enzima Cu/Zn superóxido dismutase é considerada uma das mais importantes enzimas protetoras em células aeróbias. Se assumirmos que seu papel principal é o de proteger as células contra o $O_2^{\bullet-}$, formado inevitavelmente durante o metabolismo do oxigênio, um aumento em seu conteúdo traria muitos benefícios. No entanto, tal visão seria uma simplificação das complexas relações metabólicas em um organismo (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988).

Existem evidências sobre o aumento do EO vinculado ao aumento do dano ao DNA e peroxidação lipídica em pessoas com SD (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000). Além disso, este EO parece acontecer precocemente em gestantes. Foram identificadas proteínas seletivas que mostraram oxidação aumentada no fluido

amniótico de mulheres que transportam fetos com SD em comparação com fluido amniótico de mulheres com fetos saudáveis. As proteínas identificadas estão envolvidas na homeostase do ferro, no metabolismo dos lipídios e na inflamação (PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2011).

Estudos *post-mortem* e estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o EO desempenha um papel na patogênese de muitas das características clínicas da SD (PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2011). Estudos investigaram certos aspectos do EO no córtex cerebral de fetos com SD, demonstrando EO elevado, indicado pelo aumento significativo na peroxidação lipídica *in vitro*, estimado pela formação do MDA, aumento nos níveis de PC e produtos finais de glicação avançada (AGEs) (BROOKSBANK; BALAZS, 1984; ODETTI *et al.*, 1998). Foi observado ainda aumento de 8-OHdG, proteínas oxidadas e nitrotirosina no citoplasma de neurônios cerebrais em portadores de SD (NUNOMURA *et al.*, 2000). Recentemente, Le Pecheur e colaboradores (2005) demonstraram que o aumento da peroxidação *in vitro* no cérebro de fetos com SD tem sido proposto como evidência do aumento do EO. Além disso, foi demonstrado que linfócitos de crianças com SD são mais sensíveis ao EO do que crianças sem SD (ZANA *et al.*, 2006), e múltiplas evidências de um estado pró-oxidativo em jovens indivíduos com SD, enfatizando o papel do EO no fenótipo destas pessoas (PALLARDÓ *et al.*, 2006).

O aumento na atividade da SOD1 seria a principal razão da origem da deficiência mental na SD. Em apoio a esta hipótese, pode ser citado que o aumento da atividade da SOD1 foi encontrado em eritrócitos de pacientes com outros distúrbios mentais (esquizofrenia, psicose paranóica, psicose maníaco depressiva, alucinações crônicas, Síndrome de Korsakoff, delírio paranóico e debilidade mental) (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988). Foi evidenciado, a partir de experiências com animais (EPSTEIN *et al.*, 1987), que a superexpressão da SOD1 pode alterar significativamente, tanto a expressão de neurotransmissores (ELROY-STEIN; GRONER, 1988), como a histologia neural (AVRAHAM *et al.*, 1988).

Tem sido salientado que as alterações morfológicas no cérebro de adultos com SD sugerem a ocorrência de um processo patológico de envelhecimento, e uma correlação tem sido postulada entre a SD e a demência senil do tipo Alzheimer (TAKASHIMA *et al.*, 1981). Anormalidades dendríticas no córtex visual de crianças portadoras de SD muito jovens são análogas às observadas na degeneração cerebral pré-senil e acredita-se que pressagiam a formação de placas senis (SUETSUGU; MEHRAEIN, 1980). Os níveis de SOD1 são aumentados

no tecido cerebral de pacientes com DA (MIDORIKAWA; KAWANISHI, 2001). Muitos estudos têm ligado o EO à neurodegeneração, mas no caso da SD e DA, esta correlação tem muitas outras características que se sobrepõem, devido ao fato de que alguns dos genes responsáveis pela forma familiar da DA estarem expressos no cromossomo 21, tais como SOD1, BACE-2, APP e S100 (PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2011; LOTT; HEAD, 2005). Praticamente todos os indivíduos com SD desenvolvem neuropatologia suficiente para o diagnóstico da DA com a idade de 40 anos. Características da DA, como placas β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares, são observadas no tecido cerebral de indivíduos com SD. Placas $A\beta$ começam a acumular-se na infância (aproximadamente aos 8 anos) e aumentam progressivamente com o aumento da idade, acelerando entre as idades de 35 e 45 anos. Durante este período de tempo, outros tipos de patologia ou começam a aparecer, ou são exacerbados, incluindo o acúmulo de emaranhados neurofibrilares e marcadores de neuroinflamação (LOTT; HEAD, 2005).

Estudos relataram que a frequência de alguns tumores como leucemias, linfomas e tumores de células germinativas é elevada em indivíduos com SD. Os mecanismos de carcinogênese na SD podem ser explicados pelo aumento da SOD1, que resulta em dano ao DNA induzido direta ou indiretamente via geração de $HO\bullet$ por H_2O_2 (MIDORIKAWA; KAWANISHI, 2001). Os genes cistationina- β -sintase (CBS) e Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1), localizados no cromossomo 21, codificam enzimas que contribuem para sensibilidade dos mieloblastos às drogas de quimioterapia (citosina arabinose e daunorubicina, usadas na terapia para a LMA). Isto explica a alta taxa de sobrevivência de crianças SD com LMA comparadas a crianças normais. Sendo assim, portadores da SD, embora tenham maior predisposição ao desenvolvimento de desordens hematológicas, apresentam maiores taxas de sobrevivência quando expostas aos medicamentos quimioterápicos do que pessoas sem a síndrome. A superexpressão do SOD1 aumenta a sensibilidade quimioterápica, porém aumenta a suscetibilidade a infecções, devido a uma depressão do sistema imune (TAUB; HUANG; MATHERLY, 1999; MORRISSETTE; HALLIGAN; PUNNETT, 2006).

3. OBJETIVOS

Avaliar o *status* antioxidante e o estresse oxidativo no sangue de crianças e adolescentes com Síndrome de Down.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Verificar as diferenças nos níveis intraeritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR e GST) presentes no sangue de crianças e adolescentes portadores de SD, comparativamente aos controles.

✓ Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH, ácido úrico e vitaminas E), presentes, no extrato ácido sanguíneo e plasma desses indivíduos SD, comparativamente aos controles.

✓ Verificar o comportamento dos indicadores de dano oxidativo proteínas carboniladas e níveis de lipoperoxidação ou concentração de TBARS, presentes no plasma destes indivíduos, comparativamente aos controles.

4. METODOLOGIA

4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Trata-se de um estudo de caracterização de *status* antioxidante e EO de uma amostra constituída de portadores de SD. A amostra deste estudo foi baseada em um nível de significância de 0,05. Os indivíduos selecionados para o presente estudo foram provenientes das instituições APAE - Florianópolis (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais), e Associação Amigos Down, as quais atendem famílias de pessoas com SD na grande Florianópolis/SC.

4.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo crianças e adolescentes SD com idade entre 3 e 14 anos de idade que frequentavam, no momento da triagem dos participantes, ao menos uma das instituições que colaboraram com o estudo. A inclusão ou não no projeto foi de espontânea responsabilidade dos pais ou responsáveis legais pelos participantes, quando estes recebiam informações sobre o projeto e assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos que estivessem participando de outros estudos semelhantes ou com características que impossibilitassem o fornecimento de dados, além daqueles que por outro motivo tiveram que abandonar o estudo.

4.1.3. Dados obtidos

As informações obtidas são referentes a dados constitucionais e relacionados às condições físicas e de saúde dos indivíduos participantes, os quais passaram por uma avaliação nutricional, realizada por profissional da área, composta de questionário de frequência alimentar adequado para cada faixa etária, respondido em entrevista com os responsáveis, além de análise antropométrica.

4.1.4. Definições

Os indivíduos deste estudo foram admitidos como sendo portadores de SD, considerando as características físicas evidentes e confirmação de diagnóstico pelos pais/responsáveis, bem como da instituição que os acompanha.

4.1.5. Coleta de amostras biológicas

Para análise das defesas antioxidantes e biomarcadores de dano oxidativo no presente trabalho, foram coletadas amostras de sangue em um tubo seco para a obtenção de soro e dois tubos com anticoagulante EDTA para a obtenção de plasma e sangue total. O material biológico, após processado (obtenção imediata de extratos ácidos e separação de plasma e eritrócitos), foi armazenado em nitrogênio líquido até a realização das análises propostas, sendo desprezados posteriormente. Foram observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial final. Esta etapa foi realizada nas instituições APAE e Associação Amigos Down para o grupo de crianças e adolescentes com SD (20 indivíduos com idade entre 3 e 14 anos). Para o grupo controle, foram coletadas amostras de 18 crianças em perfeito estado de saúde (marcadores inflamatórios dentro da faixa de normalidade), da mesma faixa etária, obtidas no Hospital Infantil Joana de Gusmão, de Florianópolis/SC. Nenhuma amostra foi excluída, e os responsáveis legais de todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização deste ensaio clínico, o presente protocolo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Catarina, em 28 de novembro de 2011, protocolo Nº. 2112 CEP (Anexo A). O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução nº 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas clínicas bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios clínicos (normas de *GoodClinicalPractice*). Os responsáveis pelos participantes preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A coleta de amostra venosa foi realizada em tubos contendo anticoagulante EDTA, e sem anticoagulante para obtenção de soro. Logo em seguida, alíquotas de sangue total foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C) para a análise de GSH. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 5000 g durante 3 min. Após este processo, do tubo sem anticoagulante foi separado o soro e, do tubo com EDTA foi separado o plasma e os eritrócitos os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de dano oxidativo/defesas antioxidantes. Esta etapa foi realizada com as crianças e adolescentes em suas respectivas instituições de acompanhamento, APAE ou Associação Amigos Down. As amostras foram, então, estocadas em nitrogênio líquido e transportadas até o laboratório de Ecofisiologia Respiratória, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram analisadas.

Após a chegada das amostras no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, foram preparados os hemolisados, através de lavagens dos eritrócitos com água destilada e posteriormente centrifugados (5000 g por 3 min), para então, sofrerem lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos. Uma última centrifugação (5000 g, durante 5 min) forneceu o sobrenadante (lisado) para análise dos diferentes parâmetros. Todas as frações das amostras sanguíneas foram sempre acondicionadas em nitrogênio líquido, para transporte e até sua análise correspondente, o que confere integridade às amostras, já que estudos mostram que tióis não proteicos e enzimas antioxidantes permanecem estáveis em nitrogênio líquido por, pelo menos, 6 meses (PALACE; MATEHWSKI; KLAVERKAMP, 1990).

4.4. EQUIPAMENTOS

Para o preparo de meios e soluções reagentes foram utilizados balança analítica marca Ohaus® modelo AR2140 e pH-metro marca Digimed®, modelo DM20. A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, conteúdos de GSH e outros marcadores de EO, foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível, duplo feixe, marca/modelo GBC 916 acoplado a um software apropriado.

4.5. REAGENTES

A enzima GR, os reagentes ácido tiobarbitúrico (TBA), albumina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), D- α -tocoferol, epinefrina, nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), GSH, GSSG, H₂O₂ e *tert*-butil hidroperóxido foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). O kit utilizado para dosagem de ácido úrico foi da marca Analisa (Brasil). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

4.6. DEFESAS ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.6.1. Defesas antioxidantes enzimáticas

4.6.1.1. Superóxido Dismutase (SOD)

Atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em 480 nm de acordo com o método de auto-oxidação da adrenalina descrito por Misra&Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983). A oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. A amostra adicionada na cubeta, contendo uma solução de adrenalina, retarda a oxidação e consequentemente a produção de adrenocromo através da enzima (SOD). Em uma cubeta contendo 1,95 ml de tampão glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 μ l de adrenalina 60 mM, solução que deve ser mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar durante todo o tempo de análise para evitar a oxidação. A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi monitorada durante cerca de 100 s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15 s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar diferentes alíquotas da amostra, geralmente em torno de 20 a 100 μ l, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota, totalizando um tempo de aproximadamente 3 min. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD foram expressos em termos de atividade da enzima (U SOD ml⁻¹), em que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do

adrenocromo. As amostras foram lavadas previamente com uma solução de clorofórmio:etanol (3:5 v:v) para retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

4.6.1.2. Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio, em 240 nm, durante 20 s. Para isso, foi utilizada uma solução fresca de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0, preparada e titulada no dia da análise. A determinação foi feita adicionando-se 2 ml desta solução na cubeta e acrescentando 20 μ L do lisado para realizar a leitura da queda da absorbância no comprimento de onda referido. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ (AEBI, 1984).

4.6.1.3. Glutathione peroxidase (GPx)

Para a análise enzimática de GPx, o método de Flohé&Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução do terc-butilhidroperóxido(t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx. Sendo assim, a medida consiste na oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em 340 nm, uma vez que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, catalisada pela GPx presente na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato (0,1 M pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) (5 mM pH 7,0), 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, 3,8 μ L de GR 5U e 100 μ L de KCN 50 mM, no momento do ensaio. O KCN tem como função evitar superavaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina presente nos lisados. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de amostra e 10 μ L de t-BuOOH em 1 ml de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

4.6.1.4. Glutationa redutase (GR)

O método utilizado para a análise da atividade desta enzima foi o de Carlberg e Mannervick (1985), no qual se verifica em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona redutase (GR) presente na amostra. O ensaio é realizado em um meio de reação contendo tampão fosfato (0,1 M pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 30,6 mg de glutatona oxidada (GSSG), 10 ml de DPTA (5 mM pH 7,0) e 15 ml de água destilada. O meio foi adicionado na cubeta (0,95ml), e ao acrescentar 50µl de amostra, a reação teve início e foi monitorada durante 3 min, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

4.6.1.5. Glutationa S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada segundo método descrito por Habig e colaboradores (1976), no qual a amostra é adicionada a cubeta contendo um meio composto de 10 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 µl de GSH (0,1 M) e 970 µl de tampão fosfato (0,1 M pH 7,0). Foi utilizada, ainda, uma cubeta de referência, na qual foram adicionados os mesmos reagentes, com exceção da amostra. Esta técnica baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato. Tem como princípio o uso de (CDNB) como substrato, para que a enzima GST presente na amostra conjugue a GSH ao CDBN e forme um cromóforo detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 s. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. O hemolisado utilizado para a determinação dessa enzima foi diluído 1:10, para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que poderia interferir na avaliação da cinética enzimática.

4.6.2. **Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas**

4.6.2.1. Glutationa reduzida (GSH)

A concentração de GSH no sangue total foi determinada através dos tióis não proteicos, já que a GSH representa aproximadamente 95% destes tióis (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963). Para avaliar a concentração eritrocitária de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), foi empregado o método de Beutler e colaboradores (1963), onde a adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5 mM nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 e 0,1

ml da amostra, permite, após cerca de 3 min e agitação intermitente da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. Os valores medidos em duplicata foram expressos em $\mu\text{mol}.\text{mL}^{-1}$.

4.6.2.2. Ácido Úrico (AU)

O AU é oxidado pela uricase em alantoína, CO_2 (gás carbônico) e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação de copulação oxidativa, catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio formado reage com o diclorohidroxibenzeno sulfonato (DHBS) e 4-aminoantipirina (4-AMP), produzindo uma antipirilquinonimina, de cor vermelha. A absorbância do complexo formado, medida em 520 nm, é diretamente proporcional à concentração de AU da amostra. A realização da dosagem de AU foi realizada de acordo com as instruções do Kit utilizado. Assim, foram adicionados 20 μl da amostra e padrão nos seus respectivos tubos contendo 1 ml de reagente de trabalho, constituído de tampão e uricase (4:1). Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 min, a 37°C. Na sequência foi realizada leitura das absorbâncias em 520 nm, acertando o zero com o branco (1 ml do reagente de trabalho).

4.6.2.3. Vitamina E

A determinação quantitativa dos níveis de α -tocoferol foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência/pressão (HPLC), com detecção UV, em 292 nm, segundo o método descrito por Nicoletti e colaboradores (2001). Inicialmente, foi adicionado 100 μl de plasma em 100 μl de etanol e agitado em vórtex por 10s. Em seguida, foi acrescentado 100 μl de hexano, agitado em vórtex por mais 45s, e realizada centrifugação a 8000 g por 5 min. O sobrenadante (75 μl) foi transferido para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Foram adicionados então, 25 μl de dietileter e 75 μl de metanol, com injeção desse extrato (50 μl) no sistema cromatográfico. As colunas foram eluídas isocraticamente com metanol e o fluxo foi de 1 $\text{ml}.\text{min}^{-1}$. A concentração plasmática de α -tocoferol foi determinada através de uma curva-padrão, sendo que os valores foram expressos em $\mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$.

4.6.3. Determinação dos marcadores de dano

4.6.3.1. Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada através da detecção no plasma, dos produtos derivados de oxidação decorrentes do processo de lipoperoxidação, por meio de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se como produto majoritário o MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação de plasma com ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido de agitação vigorosa e posterior incubação em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min a 100°C. O material é, então, resfriado durante 30 min a 5°C, centrifugado (5 min a 10000 g) e a mensuração do cromóforo rosa foi detectada em 535 nm, sendo os valores calculados expressos em nmol.mL^{-1} .

4.6.3.2. Proteína Carbonilada (PC)

A Proteína Carbonilada (PC) é o marcador mais amplamente utilizado para verificar modificação oxidativa das proteínas. O dano oxidativo por carbonilação das proteínas foi determinado pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Nesta técnica são adicionados 100 μL do plasma em 600 μL de DNPH (2,4-dinitro fenil hidrazina), os quais são homogeneizados (vórtex) e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação a cada 15 min. Na sequência, foi adicionado 600 μL de TCA 20%, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 5000 g). O sobrenadante foi, então, descartado e o *pellet* foi lavado por três vezes consecutivas com 800 μL etanol-acetato de etila (1:1, v:v) (centrifugação por 5 min a 14000 g). Após a última lavagem, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 600 μL de guanidina, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 60 min, para posteriormente proceder à leitura a 390 nm, utilizando a solução de guanidina como branco. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), usando como padrão a albumina. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol.mg^{-1} de proteína.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações estatísticas dos marcadores de EO foram realizadas usando Teste t de Student, para comparação pareada entre em relação ao grupo controle admitindo um nível mínimo de significância de $p < 0,05$ (5%).

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os 20 portadores da SD participantes deste estudo tem idade média de $7,7 \pm 3,18$ anos (3 a 14 anos), sendo 12 do gênero masculino (60%) e 8 do gênero feminino (40%). A maior parte dos indivíduos concentra-se na faixa etária de 6 a 10 anos (65%). Não foi observada diferença significativa entre o IMC dos portadores de SD ($17,9 \pm 0,76$) em relação aos controles ($16,9 \pm 0,61$). No grupo de indivíduos SD, 2 faziam uso de Risperidona 1 mg, 2 estavam tomando Levotiroxina sódica (PuranT4) 50 mg e 1 fazia tratamento com Ritalina 10 mg. Não foram encontradas diferenças significativas nos resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados entre os participantes que faziam uso de medicamentos e o restante do grupo.

5.2. DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

5.2.1. Atividade da SOD

Os valores da atividade da SOD nos indivíduos portadores de SD mostraram uma atividade aumentada, com valor médio de $120,2 \pm 8,2$ USOD.mL⁻¹ e alta significância *** ($p < 0,001$), em comparação aos níveis dos indivíduos saudáveis ($63,4 \pm 4,4$ USOD.mL⁻¹). Assim, foi encontrado um aumento de 47,2% na atividade da SOD dos indivíduos portadores de SD em relação ao grupo controle.

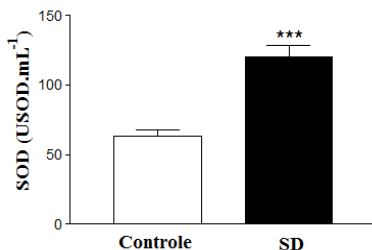


Gráfico 1: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.2.2. Atividade da CAT

A catalase apresentou atividade de $157,0 \pm 3,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ nos indivíduos portadores de SD, mostrando um aumento significativo *** ($p < 0,001$) de 24,7% em relação aos controles saudáveis ($118,2 \pm 6,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$).

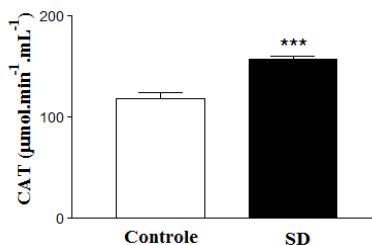


Gráfico 2: Atividade da Catalase (CAT) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.2.3. Atividade da GPx

A atividade da GPx nos indivíduos SD foi de $56,9 \pm 1,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle saudável ($58,8 \pm 0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$).

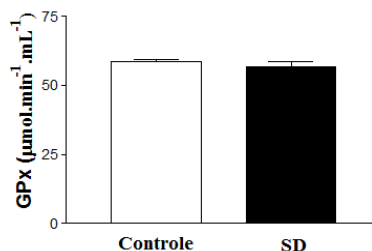


Gráfico 3: Atividade da Glutathiona peroxidase (GPx) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.2.4. Atividade da GR

Nos indivíduos SD a atividade de GR mostrou-se significativamente elevada em relação ao grupo controle saudável, apresentando valor de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($p < 0,001$), uma diferença de 49,6% comparativamente ao grupo controle ($0,5 \pm 0,04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$).

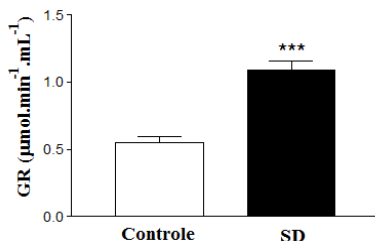


Gráfico 4: Atividade da Glutathione redutase (GR) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.2.5. Atividade da GST

Nos indivíduos portadores de SD a atividade da GST mostrou-se significativamente diminuída (61,2%), comparativamente ao grupo controle *** ($p < 0,001$). No grupo SD os valores de GST foram de $42,9 \pm 3,7 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, enquanto os controles saudáveis apresentaram atividade desta enzima de $110,6 \pm 11,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

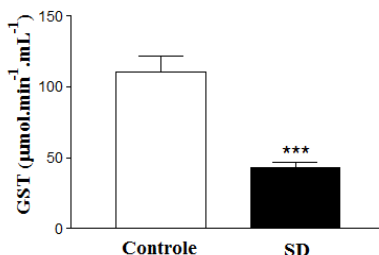


Gráfico 5: Atividade da Glutathione S-transferase (GST) no hemolisado sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.3. DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

5.3.1. Glutationa Reduzida (GSH)

O nível médio de GSH nos portadores de SD foi de $0,98 \pm 0,1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Em comparação aos indivíduos do grupo controle ($1,3 \pm 0,03 \mu\text{mol.mL}^{-1}$), os indivíduos SD apresentaram uma diminuição de baixa significância * ($p < 0,05$) para os conteúdos de GSH no sangue total, em torno de 25%.

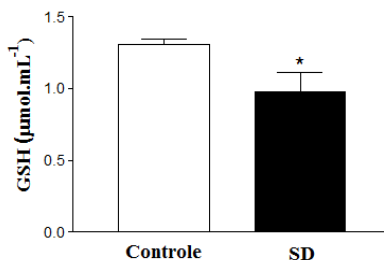


Gráfico 6: Concentração de Glutationa reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.3.2. Ácido Úrico (AU)

O nível médio de AU encontrados no grupo SD foi de aproximadamente $3,8 \pm 0,2 \text{mg.dL}^{-1}$. A dosagem de AU no sangue dos portadores de SD mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis deste analíto de 16,1% quando comparado ao grupo controle ($3,2 \pm 0,2 \text{mg.dL}^{-1}$).

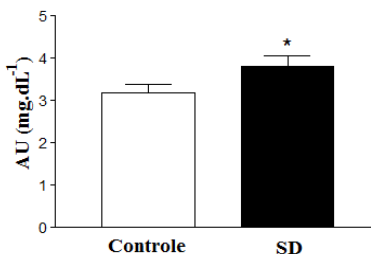


Gráfico 7: Concentração de Ácido Úrico (AU) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.3.3. Vitamina E

Nenhuma diferença significativa foi detectada nos níveis de vitamina E quando comparado indivíduos SD ($4,9 \pm 0,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$) com o grupo controle saudável ($4,5 \pm 0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

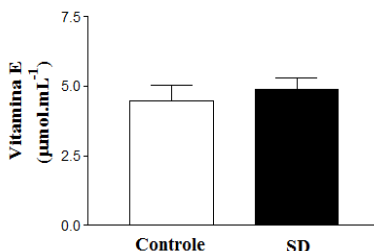


Gráfico 8: Concentração de vitamina E (Vit.E) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.4. DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO

5.4.1. TBARS (Lipoperoxidação)

Não foi observada nenhuma alteração significativa na concentração de TBARS, entre o grupo de portadores de SD ($0,0129 \pm 0.0001 \text{ nmol.ml}^{-1}$) e o grupo de indivíduos saudáveis ($0,0136 \text{ nmol.ml}^{-1} \pm 0.0001 \text{ nmol.ml}^{-1}$).

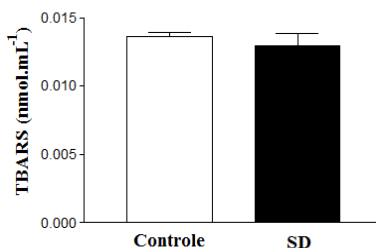


Gráfico 9: Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

5.4.2. Proteína Carbonilada (PC)

Considerando as determinações de PC, foi observada uma diminuição de baixa significância ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados. A concentração média de PC encontrada no grupo de indivíduos SD foi $0,02 \pm 0,003 \mu\text{mol.mg}^{-1}$, enquanto o grupo controle apresentou níveis deste marcador de $0,03506667 \pm 0,03 \mu\text{mol.mg}^{-1}$.

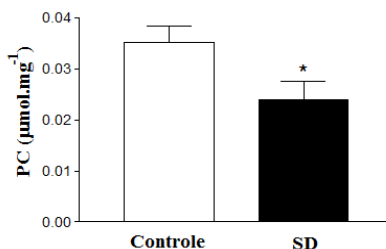


Gráfico 10: Concentração de proteína carbonilada (PC) no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle) e portadores de Síndrome de Down (SD).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram um estado pró-oxidante sistêmico em indivíduos com SD, considerando o aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes, diminuição de GSH sanguínea e níveis elevados de AU plasmático, provavelmente na tentativa de compensar o desequilíbrio no estado redox presente no sangue destes indivíduos.

A análise das enzimas antioxidantes mostrou um aumento significativo (47,2%) na atividade da enzima SOD1 no sangue dos indivíduos portadores de SD em relação ao controle. Um aumento de aproximadamente, 50% na atividade desta enzima é esperado em diferentes tipos de células, de diferentes tecidos destas pessoas. Muitos estudos forneceram provas de que o fenótipo da SD está associado ao EO, decorrente principalmente da superexpressão da SOD1. Isto tem sido investigado em diversos ensaios *in vitro*, *in vivo*, e estudos em animais. Este aumento na expressão da enzima SOD1 deve-se ao fato do gene que a codifica estar localizado na região 21q22 do cromossomo 21, relatada como sendo a região crítica para a SD (BROOKSBANK; BALÁSZ, 1984; EPSTEIN *et al.*, 1987; AGUILAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003; de HAAN *et al.*, 2003; GARCEZ; PERES; SALVADOR, 2005; MARQUES; MARREIRO, 2006).

Observou-se também um aumento significativo na atividade da enzima catalase (24,7%) nos indivíduos SD em relação ao controle. Este aumento encontrado na atividade da CAT é compatível com estudo realizado por Pastor e colaboradores (1998). Considerando que a CAT atua na decomposição de H_2O_2 até água e oxigênio, este aumento consistiria em uma resposta fisiológica e de proteção para tentar eliminar o excesso de H_2O_2 endógeno produzido pela hiperatividade da SOD1. Porém, o aumento de quase 50% na atividade da SOD1 é muito maior do que o percentual de aumento na atividade desta enzima, caracterizando a manutenção do EO sistêmico na SD.

Há uma controvérsia sobre os níveis de GPx em eritrócitos de pessoas com SD (KEDZIORA; BARTOSZ, 1988). Alguns autores relatam que não há nenhuma diferença significativa no nível de atividade desta enzima com relação aos controles (ZAKHAROV, 1979; BROOKSBANK; BALAZS, 1983; VERTONGEN *et al.*, 1984), enquanto outros têm mostrado um aumento na atividade da GPx em vários tecidos de pessoas com SD, bem como em modelos animais (SINET; LEJEUNE; JEROME, 1979; KEDZIORA *et al.*, 1982; SINET, 1982; CEBALLOS *et al.*, 1988; PASTOR, 1998). No presente trabalho

não foi encontrada diferença significativa na atividade desta enzima entre as amostras de sangue dos portadores de SD e seus controles saudáveis.

O aumento da CAT reflete uma compensação à elevada produção de H_2O_2 , substrato específico desta enzima. No entanto, a enzima GPx é, a exemplo da CAT, responsável pela conversão do H_2O_2 até água, mas também de vários outros hidroperóxidos, através da utilização e oxidação da GSH, resultando na forma oxidada da glutathione (GSSG) (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). Embora exista uma sobreposição entre a função da CAT e da GPx, as duas enzimas diferem na afinidade em relação ao H_2O_2 . Em eritrócitos, a GPx é a principal responsável pela detoxificação de H_2O_2 em condições normais, enquanto que o aumento da atividade da CAT ocorre quando altas concentrações desta ERO são produzidas sistemicamente. Deste modo, na presença de níveis mais elevados de H_2O_2 , a CAT é mais ativa do que a GPx em removê-lo das células (POWERS; LENNON, 1999; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Outro fator que pode ter contribuído para a atividade da GPx não ter aumentado, mesmo diante do acúmulo de H_2O_2 , seria a depleção dos níveis de GSH, substrato imprescindível à sua atividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), observados neste estudo. Assim sendo, o desequilíbrio entre a proporção destas enzimas e de seu substrato deve resultar em acúmulo de H_2O_2 endógeno, proporcionando um quadro de agressão oxidativa constante (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000), pois o H_2O_2 não eliminado tende a reagir com metais de transição, formando o HO^\bullet , o qual é o mais reativo e mais lesivo radical conhecido. Como consequência, podem ocorrer alterações no DNA, como modificação das bases e quebras das fitas, danos à proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica, culminando em contínuo dano celular (AGUILAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em condições de aumento do EO, o *status* da GSH é um fator crítico na determinação de perda da função mitocondrial e viabilidade celular (MEISTER; ANDERSON, 1983; SCHULZ *et al.*, 2000). O papel protetor principal da GSH contra o EO a envolve como um cofator para várias enzimas detoxificantes, como a GPx e a GST, como sequestradora direta do HO^\bullet e do oxigênio singlete, como participante do transporte de aminoácidos através das membranas plasmáticas, e como regeneradora de importantes antioxidantes, como as vitaminas C e E, de volta às suas formas reduzidas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Assim sendo, a diminuição do teor de GSH sanguínea observada em pessoas com SD poderia ser atribuída a um aumento da sua oxidação, degradação, ou diminuição da sua síntese (HAMED *et al.*, 2011). Coerentemente aos resultados obtidos no presente trabalho, níveis diminuídos de GSH foram encontrados em diversos estudos envolvendo indivíduos portadores de SD (MUCHOVÁ *et al.*, 2001; BAKAN *et al.*, 2003; PASTORE *et al.*, 2003; HAMED *et al.*, 2011).

A atividade da GR foi pouco estuda em trabalhos relacionados à população com SD. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a atividade desta enzima nos grupos experimentais avaliados apresentou um aumento significativo nos indivíduos portadores de SD, corroborando os dados encontrados por Pastor e colaboradores (1998). Sendo a GR uma flavoproteína que permite a contínua conversão de GSSG para GSH, via oxidação do NADPH para NADP (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), este aumento seria compensatório aos níveis depletados de GSH encontrados, provavelmente na tentativa de restaurar e manter as concentrações elevadas (~99%) deste importante antioxidante endógeno de todos os organismos aeróbios (WILHELM FILHO *et al.*, 2000). A atividade da GR está relacionada com a concentração de GSH, à qual atua não só na eliminação de EROs mas também na detoxificação de xenobióticos e substâncias cancerígenas, bem como na regulação das funções do sistema imunológico e de manutenção da estrutura proteica (MEISTER; ANDERSON, 1983). Assim, as relativamente baixas concentrações de GSH presentes nestes indivíduos SD, devem contribuir para o aumento constatado na atividade da GR.

As glutathione S-transferases (GSTs), compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da GSH a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico. As GSTs apresentam dois sítios ativos por dímero, cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a GSH que é muito específica para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade, para os eletrófilos (DANIELSON; MANNERVIK, 1985; HAYES; MCLELLAN, 2005). Assim, o decréscimo significativo observado na atividade da GST em indivíduos com SD poderia ser atribuído à diminuição dos níveis de GSH, consequência do aumento da geração de EROs decorrente do desequilíbrio do sistema de defesas antioxidantes presente nos indivíduos SD (HAMED *et al.*, 2011).

Existem evidências sobre a exacerbação do EO em portadores de SD, tais como o aumento do dano ao DNA, às proteínas e peroxidação lipídica (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000). A maioria dos estudos relata níveis aumentados de marcadores de danos a biomoléculas nestes indivíduos. Brooksbank e Balazs (1984) investigaram certos aspectos do EO no córtex cerebral de fetos com SD, e relataram um aumento significativo na peroxidação lipídica *in vitro*, estimado pela formação de MDA, seu produto majoritário. Outro estudo mostrou que o aumento do EO no cérebro de fetos com SD está relacionado ao aumento da peroxidação *in vitro* (LE PECHEUR *et al.*, 2005). Quando avaliaram marcadores de peroxidação lipídica, Praticò e colaboradores (2000) acharam níveis elevados de isoprostanos em amostras de urina de pessoas com SD comparados às amostras do grupo controle. Estes resultados sugeriram que um aumento *in vivo* na peroxidação lipídica é um componente precocemente encontrado no curso da SD. Além disso, análises químicas de amostras de urina e de sangue de portadores de SD revelaram níveis elevados de MDA e 8-deoxiguanosina, sendo este o marcador mais comumente utilizado para avaliar dano ao DNA (JOVANOVIĆ; CLEMENTES; MACLEOD, 1998). Porém, no presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de TBARS, enquanto o nível de proteínas carboniladas (PC) apresentou-se diminuído em relação aos controles saudáveis. Outros estudos também não obtiveram diferença significativa nos níveis de TBARS em amostras de urina, eritrócitos e soro desta população (MUCHOVÁ *et al.*, 2001; MEGUID *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2011).

Estes resultados relacionados aos danos oxidativos acima descritos e que caracterizam alteração na capacidade antioxidante poderiam estar relacionados aos níveis elevados de AU encontrados no sangue dos indivíduos portadores de SD neste trabalho e igualmente em outros estudos (POGRIBNA *et al.*, 2001; NAGYOVÁ; SUSTROVÁ; RASLOVÁ, 2000; CAMPOS *et al.*, 2010). Campos e colaboradores (2010) relataram um aumento significativo dos níveis de AU também na urina de crianças com SD. A partir destes resultados, foi proposto que os níveis semelhantes de biomarcadores de oxidação lipídica (TBARS) entre SD e controles, poderiam refletir uma maior resistência à oxidação lipídica em pessoas com SD, devido ao aumento nos níveis séricos de AU, repetidamente observado em portadores desta síndrome, o qual é um eficiente antioxidante hidrofílico (NAGYOVÁ; SUSTROVÁ; RASLOVÁ, 2000; CAMPOS *et al.*, 2011). O AU reduz o radical peróxil (ROO^\bullet) à hidroperóxido (ROOH), bloqueando sua degradação em

aldeídos de baixo peso molecular, incluindo o MDA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Assim, um sistema que aumenta os níveis séricos de AU, como é o caso de indivíduos com SD, uma formação de MDA atenuada é esperada, apesar dos níveis geralmente aumentados de ROOH (AMES *et al.*, 1981; CECCHINI; ARUOMA; HALLIWELL, 1990; MAXWELL *et al.*, 1997; SIMÃO *et al.*, 2008).

Associação semelhante poderia ser feita em relação ao resultado obtido nos níveis de PC, apesar da escassez de dados relacionando este marcador com a população de estudo. Campos e colaboradores (2010) encontraram diferenças significativas em relação aos níveis de diTyr (ditirosina) quando compararam crianças SD com hipotireoidismo e seus irmãos não portadores de SD. O grupo controle (irmãos) apresentou níveis de diTyr menor que os portadores de SD.

Trabalho realizado com crianças com SD mostrou que ácidos graxos monoinsaturados são mais prevalentes em portadores de SD em relação aos controles saudáveis, pareados por idade biológica. Sabe-se que ácidos graxos poli-insaturados são mais susceptíveis à oxidação do que os monoinsaturados. Desta forma, verificou-se uma maior preservação dos mecanismos oxidativos da membrana celular em portadores de SD, quando relacionados a seus respectivos controles (SANTOS, 2006).

Os resultados do presente estudo revelaram que os níveis de vitamina E não exibiram diferença significativa entre os indivíduos SD em relação ao grupo controle, o que está de acordo com os dados verificados em outro estudo com crianças portadoras de SD (MEGUID *et al.*, 2010). A vitamina E é o principal antioxidante da membrana celular e de organelas, responsável pela transferência de um hidrogênio fenólico para os radicais livres peroxil, resultantes da peroxidação de poli-insaturados, inibindo a cadeia de reação destes ácidos graxos nas membranas dos fosfolipídios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). O tocoferol age de maneira catalítica como antioxidante lipossolúvel na membrana, interagindo não enzimaticamente com o ascorbato na fase aquosa da superfície da membrana (FANG; YANG; WU, 2002; COZZOLINO, 2005). Durante o EO, o ácido ascórbico é esgotado primeiro, seguido da coenzima Q10, indicando que esses dois antioxidantes são muito sensíveis ao EO. O α -tocoferol é o antioxidante lipossolúvel melhor conhecido. Ele permanece inalterado no início do insulto oxidativo, e preferentemente, requer o ácido ascórbico, GSH e a coenzima Q10 como co-antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é

efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004). Vários estudos sugerem que micro-nutrientes essenciais como ácido fólico, vitamina B6, C e E, zinco, selênio, ácido α -lipóico e L-cisteína, iniciados no pré-natal, na infância ou mesmo após, podem prevenir ou atrasar o início de problemas cognitivos em pessoas com SD (ANI; GRANTHAM-MCGREGOR; MULLER, 2000; THIEL; FOWKES, 2005). Jackson e colaboradores (2008) avaliaram os níveis de vitamina E em 12 pessoas com SD e com DA, e 12 pessoas somente com SD. Os níveis de vitamina E no plasma do primeiro grupo foi estaticamente menor do que no grupo apenas SD. Além disso, Lockrow e colaboradores (2009) avaliaram se uma suplementação de vitamina E em ratos Ts65Dn (modelo animal de SD) reduzia o EO no cérebro. Obtiveram como resultados, que a suplementação não só reduziu os marcadores de EO no cérebro, como melhorou a performance da memória espacial e atenuou a patologia neurocolinérgica. Concluíram que o estudo forneceu evidências que a vitamina E atrasa o início das anormalidades cognitivas e morfológicas em modelos animais de SD e que isto pode representar um seguro e efetivo tratamento precoce na progressão da neuropatologia da SD. Logo, a possibilidade de uso terapêutico dos antioxidantes parece ser indicada para reduzir a severidade da SD (ZANA; JANKA; KÁLMÁN, 2007).

O presente trabalho apresenta resultados consistentes da presença de EO sistêmico nas crianças e adolescentes portadores de SD, caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GR acompanhado da depleção dos níveis de GSH e aumento de AU. Este quadro provavelmente é consequência de um mecanismo compensatório devido à crônica elevação da geração de EROs determinada pela Trissomia 21. Situação semelhante, com presença evidente de um quadro de EO, foi observada em outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa envolvendo outras patologias, como em pacientes chagásicos (MAÇÃO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.* 2010; BUDNI *et al.*, 2012), pacientes com hepatite C (FARIAS, 2009), vítimas de acidente botrópico (STRAPAZZON, 2011), crianças com fibrose cística (BENNEMANN, 2011), bem como em estudo de contaminação ocupacional em pessoas expostas à emissão de poluentes atmosféricos provenientes de incineradores de resíduos sólidos de serviços de saúde e da mineração de carvão (POSSAMAI *et al.*, 2010; WILHELM FILHO *et al.*, 2010).

Os trabalhos mencionados envolvendo Doença de Chagas, Hepatite C e pessoas expostas à emissão de poluentes atmosféricos,

apresentaram resultados concretos do efeito protetor da suplementação vitamínica, promovendo uma atenuação do dano oxidativo no sangue dos participantes. Nos pacientes chagásicos tratados com benzonidazol (RIBEIRO *et al.*, 2010) e nos pacientes com hepatite C tratados com ribavirina e interferon (FARIAS, 2009) ficou evidente a eficácia da combinação das vitaminas E e C em atenuar o EO relacionado com os respectivos tratamentos. Além disso, aparentemente, o insulto oxidativo associado à cronicidade da doença cardíaca de Chagas, foi atenuado após ciclos de intervenção antioxidante, e este efeito mostrou relativa persistência entre os intervalos destes ciclos de suplementação com vitaminas antioxidantes (BUDNI *et al.*, 2012).

Diante do exposto, uma intervenção nutricional introduzida precocemente poderia ser benéfica, atenuando os danos relacionados ao EO sistêmico e crônico em crianças com SD, demonstrado neste estudo e por outros autores, trabalho de doutorado em desenvolvimento em nosso laboratório.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a presença de Trissomia 21 em crianças e adolescentes tem como consequência alterações bioquímicas que contribuem para um EO sistêmico exacerbado nos portadores de SD.

8. PERSPECTIVAS

Sendo a SD a causa mais comum de deficiência genética intelectual e diante do aumento da expectativa de vida destes indivíduos nos últimos anos, os resultados obtidos no presente trabalho indicam possibilidades futuras visando uma melhor qualidade de vida para os portadores desta síndrome com o objetivo de prevenir o aparecimento e/ou a progressão de doenças associadas ao EO elevado presente na SD. Assim, seria oportuno:

- ✓ A ampliação do estudo com um número maior de indivíduos em diferentes faixas etárias.

- ✓ Dar prosseguimento ao estudo com a intervenção antioxidante através de suplementação vitamínica, visando atenuar características e doenças secundárias relacionadas ao EO nestes indivíduos.

- ✓ Sendo a intervenção antioxidante efetiva, viabilizar a possibilidade de implementar uma suplementação com vitaminas antioxidantes às diretrizes utilizadas para o tratamento de pessoas com SD.

- ✓ Determinar biomarcadores adicionais de dano oxidativo mais sensíveis e específicos para determinação de lipoperoxidação, avaliação de dano proteico, como por exemplo, determinação de diTyr, bem como avaliação de dano ao DNA, através da 8-deoxiguanosina. Realizar a técnica de FRAP, o qual é um importante indicador genérico de EO, quando associado aos demais parâmetros analisados.

REFERENCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. v. 204, p. 234-254, 1984.
- AGUILAR-DA-SILVA, R.H.; MORAES, T.P.; MORAES, G. Implicações do estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitário de pessoas com Síndrome de Down. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*.v. 25, n. 4, p. 231-237, 2003.
- AIRAKSINEN, E.M.; KAUKO, K. Effect of probenecid on 5-hydroxyindoles in cerebrospinal fluid in Down's syndrome. *Annals of Clinical Research*.v.5, p. 392-394, 1973.
- ALBERMAN, E.; NICHOLSON, A.; WALD, K. Severe learning disability in young children: likely future trends. London: Wolfson Institute of Preventive Medicine, 1992.
- ALFADDA, A.A.; SALLAM, R.M. Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. v. 2012, p. 1-14, 2012.
- AL-KASIM, F.; DOYLE, J.J.; MASSEY, G.V.; WEINSTEIN, H.J.; ZIPURSKY, A. Incidence and treatment of potentially lethal diseases in transient leukemia of Down Syndrome: Pediatric Oncology Group Study. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. v. 24, n. 1, p. 9-13, 2002.
- AMES, B.N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical- caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* .v. 1, n. 78, p. 6858-6862, 1981.
- ANDERSON D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*. v. 350, n. 1, p. 103-108, 2000.
- ANI, C.; GRANTHAM-McGREGOR, S.; MULLER, D. Nutritional supplementation in Down syndrome: theoretical considerations and

current status. *Developmental Medicine & Child Neurology*. v. 42, p. 207-213, 2000.

ANTONARAKIS, S.E. 10 years of genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics*. v. 51, n. 1, p. 1-16, 1998.

ANTONARAKIS, S.E.; LYLE, R.; DERMITZAKIS, E.T.; REYMOND, A.; DEUTSCH, S. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature Reviews Genetics*. v. 5, n. 10, p. 725-738, 2004.

AVRAHAM, K.B.; SCHECKLER, M.; SAPOZNIKOV, D.; YAROM, R.; GRONER, Y. Down's Syndrome: abnormal neuromuscular function in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase. *Cell*. v. 54, p. 823-829, 1988.

BAKAN, N.; TAYSI, S.; YILMAZ, Ö.; BAKAN, E.; KUSKAY, S.; UZUN, N.; GÜNDOĞDU, M. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu–Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinica Chimica Acta*. v.338, p. 143-149, 2003.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; OHARA, A. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Química Nova*. v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BENNEMANN, G.B. Marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em crianças e adolescentes com fibrose cística [Dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2011.

BERGER, P.; LEITNER, N.K.V.; DORÉ, M.; LEGUBE, B. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. *Water Research*. v. 33, n. 2, p. 433-441, 1999.

BERKOWITZ, C.D. Pediatrics: A primary care approach. 2^a Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 76-83, 2000.

BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. v. 272, p. 20313-20316, 1997.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology*. v. 90, p. 105-110, 1984.

BLEHAUT, H.; MIRCHER, C.; RAVEL, A.; CONTE, M.; PORTZAMPARC, V.; PORET, G.; HUON, F.; RETHORE, K.M.O.; STURTZ, F.G. Effect of Leucovorin (Folinic Acid) on the Developmental Quotient of Children with Down's Syndrome (Trisomy 21) and Influence of Thyroid Status. *PLoS ONE*. v. 5, n.1, p. 1-9, 2010.

BORG, D.C.; SCHAICH, K.M. Iron and iron-derived radicals. In: Halliwell B. (ed): Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium. Apr 27-29, 1987. Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. Oxygen, Gene Expression and Cellular. Marcel Dekker: New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*. v. 34, p. 707-717, 1973.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOC, O.R. Increased Chemiluminescence and Superoxide Production in the Liver of Chronically Ethanol-Treated Rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.

BROOKSBANK, B.W.L.; BALAZS, R. Superoxide dismutase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Lancet*. v. 1, p. 881-882, 1983.

BROOKSBANK, B.W.L.; BALAZS, R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Research*. v. 318, p. 37-44, 1984.

BUDNI, P.; LINO, M.R.O.; PEDROSA, R.C.; GARLET, T.R.; SIMIONATO, E.L.; WILHELM FILHO, D.; FRODE, T.S.; DALMARCO, J.B.; AMARA, J.A.; DALMARCO, E.M. Carvedilol atenua o estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v. 98, p. 218-224, 2012.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. v. 6, p. 391-397, 1997.

CAMPOS, C.; GUZMÁN, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, E.; CASADO, A. Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down Syndrome. *Clinical Biochemistry*. v. 43, p. 228-233, 2010.

CAMPOS, C.; GUZMÁN, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, E.; CASADO, A. Evaluation of urinary biomarkers of oxidative/nitrosative stress in children with Down syndrome. *Life Sciences*. v. 89, p. 655-661, 2011.

CANDEIAS, L.P.; PATEL, K.B.; STRATFORD, M.R.L.; WARDMAN, P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS LETTERS*. v. 333, p. 151-153, 1993.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 38, p.1482-1495, 2006.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*. v. 157, p.1-11, 2009.

CEBALLOS, I.; DELABAR, J.M.; NICOLE, A.; LYNCH, R.E.; HALLIWELL, R.A.; KAMOUN, P.; SINET P.M. Expression of transfected human Cu/Zn superoxide dismutase gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of glutathione peroxidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Structure and Expression*. v. 949, p. 58-64, 1988.

CECARINI, V.; GEE, J.; FIORETTI, E.; AMICI, M.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A.M.; KELLER, J.N. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1773, p. 93-104, 2007.

CECCHINI, R.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes, liposomes or from DNA damaged by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radical Research Communications*. v. 10, p. 245-258, 1990.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHAPMAN, M.J.; STERN, J. Uric acid in Down's disease. *Journal of Mental Deficiency Research*. v. 8, p. 119-124; 1964.

COOLEY, W.C.; GRAHAM, J.M. Down Syndrome: An update and review for the primary pediatrician. *Clinical Pediatrics*. v. 30, p. 233-253, 1991.

COSTA, R.M.A.; CHIGANÇAS, V.; CARVALHO, H.; MENCK, C.F.M. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. v. 85, n. 11, p. 1083-1099, 2003.

COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L.; KUMAR, V. Robbins Pathologic Basis of Disease. 5^a ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994.

COZZOLINO, S.M.F. Vitamina E (tocoferol). *In: Biodisponibilidade de nutrientes*. c. 10, p. 272-288, 2005.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. v. 329, p. 23-38, 2003.

DANIELSON, U.H.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochemical Journal*. v. 231, n. 2, p. 263-267, 1985.

de HAAN, J.B.; SUSIL, B.; PRITCHARD, M.; KOLA, I. An altered antioxidant balance occurs in Down syndrome fetal organs: implications for the “gene dosage effect” hypothesis. *Journal of Neural Transmission Supplementum*. v. 67, p. 67-83, 2003.

de RUBENS, J.F.; MANGANA, B.P.; HACH, J.L.P.; JIMÉNEZ, C.C.; URBINA, R.C. Heart malformations in children with Down syndrome. *Revista Espanhola de Cardiologia*. v. 56, p. 894-899, 2003.

DOWN, J.L. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports*, v.3, p. 250-263, 1866.

DURIC, K.; SKRABLIN, S.; LESIN, J.; KALAFATIC, D.; KUVACIC, I.; SUCHANEK, E. Second trimester total human chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein and unconjugated estriol in predicting pregnancy complications other than fetal aneuploidy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. v. 110, p. 12-15, 2003.

EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 118, n. 1, p. 3-4, 1991.

ELLIS, J.M.; TAN, H.K.; GILBERT, R.E.; MULLER, D.P.R.; HENLEY, W.; MOY, R.; PUMPHREY, R.; ANI, C.; DAVIES, S.; EDWARDS, V.; GREEN, H.; SALT, A.; LOGAN, S. Supplementation with antioxidants and folic acid for children with Down's syndrome: randomised control trial. *British Medical Journal*. v. 15, n. 336, p. 594-597, 2008.

ELROY-STEIN, O.; GRONER, Y. Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase:

implication for gene dosage effects in Down syndrome. *Cell*. v. 52, n. 2, p. 259-267, 1988.

EPSTEIN, C.J.; AVRAHAM, K.B.; LOVETT, M.; SMITH, S.; ELROY-STEIN, O.; ROTMAN, G.; BRY, C.; GRONER, Y. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: Animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 84, p. 8044-8048, 1987.

EVANS, M.D.; COOKE, M.S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioassays*. v. 26, p. 533-542, 2004.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FARIAS, M. S. Avaliação da intervenção nutricional com vitaminas E e C e o mineral zinco no estresse oxidativo de pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado a ribavirina[Dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2009.

FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; GUARNIERI, C.; CALDARERA, M.; ALBERTINI, A.; VISIOLI, O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v. 17, p. 937-945, 1985.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assaysof glutathione peroxidase. *Methods Enzymology*. v. 105, p. 114-121, 1984.

FONG, C.T.; BRODEUR, G.M. Down's Syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. v. 28, n. 1, p. 55-76, 1987.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. p.72-86. *In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* Cardoso *et al.* (Orgs.). Sarvier, São Paulo - SP, 2003.

FREEMAN, S.B.; TAFT, L.F.; DOOLEY, K.J., ALLRAN, K.; SHERMAN, S.L.; HASSOLD, T.J.; KHOURY, M.J.; SAKER, D.M. Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics.* v. 80, p. 213-217, 1998.

FRIDMAN C. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Revista de Psiquiatria Clínica.* v. 31, p. 119-125, 2004.

FRIED, R.; FRIED, L.W.; BABIN, D.R. Biological role of xanthine oxidase and tetrazolium-reductase inhibitor. *European Journal Biochemistry.* v. 33, p. 439-445, 1973.

GARCEZ, M.E.; PERES, W.; SALVADOR, M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down Syndrome. *Mayo Clinical Proceedings.* v. 80, n. 12, p. 1607-1611, 2005.

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. *In: Vigo-Pelfrey, C. (ed): Membrane lipid oxidation.* 1^a ed. Santa Clara, CRC Press, p. 2-30, 1991.

GETZ, L.; KIRKENGEN, A.L. Ultrasound screening in pregnancy: advancing technology, soft markers for fetal chromosomal aberrations, and unacknowledged ethical dilemmas. *Social Science & Medicine.* v. 56, p. 2045-2057, 2003.

GOLDSTEIN, H. Menarche, menstruation, sexual relations and contraception of adolescent females with Down syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* v.27, p. 343-349, 1988.

GRANZOTTI, J.A.; PANETO, I.L.C.; AMARAL, F.T.V.; NUNES, M.A. Incidência de cardiopatias congênitas na Síndrome de Down. *Journal of Pediatrics.* v. 71, p. 28-30, 1995.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. v. 53, n. 1, p. 110-118, 2004.

GRIENGLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury, Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRIFFITHS, A.J.F. Introdução a Genética, 6ª ed. Editora: Guanabara Koogan, 1998.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. v. 249, p. 7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals Biology and Medicine*. 4ª ed. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAMED, R.R.; MAHAREM, T.M.; ABDEL-MEGUID, N.; SABRY, G.M.; ABDALLA, A.M.; GUNEIDY, A.R. Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: A comparative study. *Research in Developmental Disabilities*. v. 32, p. 1470-1482, 2011.

HASLE, H.; KEERNDROP, G.; JACOBSEN, B.B. Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. *Leukemia*. v. 9, p. 1569-1572, 1995.

HATTORI, M.; FUJIYAMA, A.; TAYLOR, T.D. *et al.* The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. v. 405, p. 311-319, 2000.

HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1504, p. 196-219, 2001.

HAYES, J.D.; MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Radical Research*. v. 31, p. 273-300, 1999.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars in Hematology*. v. 26, p. 277-285, 1989.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v. 23. n. 3. p. 418-424, 2004.

HUNG, J.H.; FU, C.Y.; YUAN, C.C.; CHEN, C.L.; YANG, M.L.; SHU, L.P.; WU, C.C. Nuchal translucence incorporated into a one-stage multifactorial screening model for down syndrome prediction at second-trimester pregnancy. *Ultrasound in Medicine & Biology*. v. 29, p. 1667-1674, 2003.

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A.M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*. v. 10, p. 2495-2505, 2003.

ISACSON, O.; SEO, H.; LIN, L.; ALBECK, D.; GRANHOLM, A.C. Alzheimer's disease and Down's Syndrome: roles of APP, trophic factors and Ach. *Trends in Neurosciences*. v. 25, p. 79-84, 2002.

JACKSON, C.V.E.; HOLLAND, A.J.; WILLIAMS, C.A.; DICKERSON, J.W.T. Vitamin E and Alzheimer's disease in subjects with Down's syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*. v. 32. n. 6. p. 479-484, 2008.

JENSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure*. v. 666-667, p. 387-392, 2003.

JOVANOVIC, S.V.; CLEMENTS, D.; MACLEOD, K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radicals Biology and Medicine*. v. 25, p. 1044-1048, 1998.

KAPPUS, H.; DIPLOCK, A.T. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 13, p. 55-74, 1992.

KEDZIORA, J.; BARTOSZ, G. Down's Syndrome: balance a pathology involving the lack of Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 4, p. 317-330, 1988.

KEDZIORA, J.; LUKASZEWICZ, R.; KOTER, M.; BARTOSZ, G.; PAWŁOWSKA, B.; AITKIN, D. Red blood cell glutathione peroxidase in simple trisomy 21 and translocation 21/22. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 38, n. 5, p. 543-544, 1982.

KEDZIORA, J.; SOSZYFSKI, M.; BARTOSZ, G.; WITAS, H.; LEYKO, W. Down's syndrome: Changes in protein fractions of blood plasma. *Experientia*. v. 36, p. 926-927, 1980.

KEDZIORA, J.; WACHOWICZ, B. Determination of serum glycoproteins of children with Down's syndrome. *Endokrynologia Polska*. v. 25, p. 14-20; 1974.

KIVIVUORI, S.M.; RAJANTIE, J.; SIIMES, M.A. Peripheral blood cell counts in infants with Down's syndrome. *Clinical Genetics*. v. 49, p. 15-19, 1996.

KORENBERG, J.R.; CHEN, X.N.; SCHIPPER, R.; SUN, Z. *et al.* Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.91, p. 4997-5001, 1994.

KORENBERG, J.R.; KAWASHIMA, H.; PULSI, S.; IKEUCHI, T.; OGAZAWARA, N.; YAMAMOTO, K.; SCHONBERG, S.A.; WEST, R.; ALLEN, L.; MAGENIS, E.; IKAWA K., TANIGUCHI, N.; EPSTEIN, C.J. Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *American Journal of Human Genetics*. v. 47, p. 236-246, 1990.

KORENBERG, J.R.; PULST, S.M.; GERWEHR, S. Advances in the understanding of chromosome 21 and Down Syndrome. In: Lott, I.; McCoy, E. editors. Down syndrome: advances in medical care. New York: Wiley-Liss. p. 3-12, 1992.

LANGE, B. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *British Journal of Haematology*. v. 110, p. 512-524, 2000.

LE PECHEUR, M.; BOURDON, E.; PALY, E.; FAROUT, L.; FRIGUET, B.; LONDON, J. Oxidized SOD1 alters proteasome activities *in vitro* and in the cortex of SOD1 overexpressing mice. *Federation of European Biochemical Societies*. v. 579. p. 3613-3618, 2005.

LESHIN, L. Trissomy 21: the history of Down Syndrome. Disponível em <http://www.ds-health.com/>. Acesso em: 24/05/2012. Down Syndrome: Health Issues: news and information for parents and professionals, 2000.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. v. 186, p. 464-478, 1990.

LEVY, J. The gastrointestinal tract in Down syndrome. *Progress in Clinical and Biological Research*. v. 373, p. 245-256, 1991.

LOCKROW, J.; PRAKASAMA, A.; HUANG, P.; BIMONTENELSON, H.; SAMBAMURTI, K.; GRANHOLMA, A.C. Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Experimental Neurology*. v. 216, p. 278-289, 2009.

LOTT, I.T.; HEAD, E. Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiology of Aging*. v. 26, p. 383-389, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAÇAO, L.B.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C.; PEREIRA, A.; BACKES, P.; TORRES, A.M.; FRÖDE, T.S. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*. v. 123, p.43-49, 2007.

MANN, K.; FOX, S.P.; ABBS, S.J.; YAU, S.C.; SCRIVEN, P.N.; DOCHERTY, Z.; OGILVIE, C.M. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet*. v. 358, n. 9287, p. 1057-1061, 2001.

MARQUES, R.C.; MARREIRO, D.N. Aspectos metabólicos e funcionais do zinco na Síndrome de Down. *Revista de Nutrição*. v. 19, n. 4, p. 501-510, 2006.

MATOS, S.B.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, C.S.; BORGES, K.S. Síndrome De Down: Avanços e Perspectivas. *Revista Saúde.com*. v. 3, n. 2, p. 77-86, 2007.

MAXWELL, S.R.; THOMASON, H.; SANDLER, D.; LEGUEN, C.; BAXTER, M.A.; THORPE, G.H.G.; JONES, A.F.; BARNETT, A.H. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. v. 27, p. 484-490, 1997.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. v. 244, n. 22, p. 6049-6065, 1969.

MEGUID, N.A.; DARDIR, A.A.; EL-SAYED, E.M.; AHMED, H.H.; HASHISH, A.F.; EZZAT, A. Homocysteine and oxidative stress in Egyptian children with Down syndrome. *Clinical Biochemistry*. v. 43, p. 963-967, 2010.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. v. 52, p. 711-760, 1983.

MELLO, A.C.F.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemical Journal*. V. 218, P. 273-275, 1983.

MÉNDEZ, J.D.F.; RODRÍGUEZ H.G.R. Sobre los beneficios de los radicales libres. *Revista Médica de IMSS*. v. 35, n. 4, p. 309-313, 1997.

MENENDEZ M. Down Syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain Development*. v. 27, p. 246-252, 2005.

MERCER, E.S.; BROECKER, B.; SMITH, E.A.; KIRSCH, A.J.; SCHERZ, H.C.; MASSAD, C.A. Urological manifestations of Down syndrome. *Journal of Urology*. v. 171, p. 1250-1253, 2004.

MIDORIKAWA, K.; KAWANISHI, S. Superoxide dismutases enhance H₂O₂-induced DNA damage and alter its site specificity. *Federation of European Biochemical Societies*. v. 495, n. 3, p. 187-190, 2001.

MIKKELSEN, M. New aspects of a well-known syndrome (Down syndrome-mongolism). *European Journal of Pediatrics*. v. 136, p. 5-7, 1981.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. v. 247, p. 188-192, 1972.

MOREIRA, L.M.A.; CHARBEL, N.E.; GUSMÃO, F.A.F. A Síndrome de Down e sua Patogênese: considerações sobre o determinismo genético. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. v. 22, n. 2, p. 96-99, 2000.

MOREL, I.; ABALEA, V.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. *Methods in Enzymology*. v. 335, p. 308-316, 2001.

MORENO, S.N.; PALMERO, D.J.; EIGUCHI, P.K.; DOCAMPO, R.; STOPPANI, A.O. Stimulation of lipid peroxidation and ultrastructural alterations induced by nifurtimox in mammalian tissues. *Medicina*. v. 40, n. 5, p. 553-559, 1980.

MORRISSETTE, J.J.D.; HALLIGAN, G.E.; PUNNETT, H.H. Down syndrome with low hipodiploidy in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics e Cytogenetics*. v. 169, p. 58-61, 2006.

MUCHOVÁ, J.; SUSTROVÁ, M.; GARAIOVÁ, I.; LIPTÁKOVÁ, A.; BLAZICEK, P.; KVASNICKA, P.; PUESCHEL, S.; DURACKOVÁ, Z. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 31, n. 4, p. 499-508, 2001.

MUSTACCHI, Z.; PERES, S. *Genética Baseada em Evidências Síndromes e Heranças*. São Paulo: CID Editora, 2000.

NAGAOKA, S.I.; HASSOLD, T.J.; HUNT, P.A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics*. v. 13. p. 493-504, 2012.

NAGIOVÁ, A.; SUSTROVÁ, M.; RASLOVÁ, K. Serum Lipid Resistance to Oxidation and Uric Acid Levels in Subjects with Down's syndrome. *Physiological Research*. v. 49, p. 227-231, 2000.

NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADI, R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 38, n. 12, p. 1825-1834, 2005.

NHI - National Institutes of Health Research Plan on Down Syndrome: <http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/downsyndrome/down.htm>. Acesso em: 25 de novembro de 2012. Facts about Down Syndrome, 2007.

NICOLETTI, G.; CRESCIBENE, L.; SCORNAIENCHI, M.; BASTONE, L.; BAGALÀ, A.; NAPOLI, I.D., CARACCIOLO, M.; QUATTRONE, A. Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. v. 33, p.7-12, 2001.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1488, p.167-181, 2000.

NOBLE, J. Natural history of Down's syndrome: a brief review for those involved in antenatal screening. *Journal of Medical Screening*. v. 5. p. 172-177, 1998.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NUNOMURA, A.; PERRY, G.; PAPPOLLA, M.A.; FRIEDLAND, R.P.; HIRAI, K.; CHIBA, S.; SMITH, M.A. Neuronal oxidative stress precedes amyloid- β deposition in Down syndrome. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. v. 59, n. 11, p. 1011-1017, 2000.

NUSSBAUM, R.L.; MCLNNES, R.R.; WILLARD, H.F. *In*: Thompson e Thompson Genética Médica. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 387, 2002.

ODETTI, P.; ANGELINI, G.; DAPINO, D.; ZACCHEO, D.; GARBALDI, S.; DAGNA-BRICARELLI, F.; PIOMBO, G.; PERRY, G.; SMITH, M.; TRAVERSO, N.; TABATON, M. Early glycooxidation damage in brains from Down's syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 243, n. 3, p. 849-851, 1998.

OLIVEIRA, T.B.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*. v.116, n. 3, p. 357-363, 2007.

PAL YU, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. v. 74, p. 139-162, 1994.

PALACE, V.P.; MATEHWSKI, H.S.; KLAVERKAMP, J.F. Effects of sampling and storage conditions on the stability of biochemical parameters measured in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 95, p. 51-55, 1990.

PALLARDÓ, F.V.; DEGAN, P.; D'ISCHIA, M.; KELLY, F.J.; ZATTERALE, A.; CALZONE, R.; CASTELLO, G.; FERNANDEZ-DELGADO, R.; DUNSTER, C.; LLORET, A.; MANINI, P.; PISANTI, M.A.; VUTTARIELLO, E.; PAGANO, G. Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down syndrome patients. *Biogerontology*. v. 7, p. 211-220, 2006.

PASTOR, M.C.; SIERRA, C.; DOLADÉ, M.; NAVARRO, E.; BRANDI, N.; CABRÉ, E.; MIRA, A.; SERÉS, A. Antioxidant enzyme and fatty acid status in erythrocytes of Down syndrome patients. *Clinical Chemistry*. v. 44, n. 5, p. 924-929, 1998.

PASTORE, A.; TOZZI, G.; GAETA, L.M.; BERTINI, E.; FEDERICI, G.; DIGILIO, C.M.; PIEMONTE, F. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in children with Down syndrome. *The Journal of Pediatrics*. v. 142, p. 583-585, 2003.

PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, A.D. The identification of protein biomarkers for oxidative stress in Down syndrome. *Expert Review of Proteomics*. v. 8, n. 4, p. 427-429, 2011.

PINTO, M.; NEVES, J.; PALHA, M.; BICHO, M. Oxidative stress in Portuguese children with Down syndrome. *Down syndrome Research and Practice*. v. 8, n. 2, p. 79-82, 2002.

POGRIBNA, M.; MELNYK, S.; POGRIBNY, I.; CHANGO, A.; YI, P.; JAMES, S.J. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *American Journal of Human Genetics*. v. 69, p. 88-95, 2001.

POLANI, P.E.; ALBERMAN, E.; BERRY, A.C.; BLUNT, S.; SINGER, J.D. Chromosome abnormalities and maternal age. *Lancet*. v. 308, n. 7984, p. 516-517, 1976.

POSSAMAI, F.P.; GARLET, T.R.; JÚNIOR, S.Á.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; INÁCIO, D.B.; DAL-PIZZOL, F.; FILHO, D.W. Antioxidant intervention compensates oxidative stress in blood of subjects exposed to emissions from a coal electric-power plant in South Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 30, p. 175-180, 2010.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*. v. 58, n. 4, p. 1025-1033, 1999.

PRATICÒ, D.; CLARK, C.M.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G.A. Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a non invasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Annals of Neurology*. v. 48, n. 5, p. 809-812, 2000.

PUESCHEL, S.M. Síndrome de Down: guia para pais e educadores. 11^a Ed. Campinas: Papirus, p. 306, 2006.

REGEZI, J.; SCIUBBA, J. Oral pathology Clinical Pathologic Correlations.1^a Ed. In: Regezi, Sciubba, editors. Philadelphia: W.B. Saunders Co. p. 450-451, 1989.

RIBEIRO, C.M.; BUDNI, P.; PEDROSA, R.C.; FARIAS, M.S.; PARISOTTO, E.B.; DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; COLEPICOLO, P.; FILHO, D.W. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*. v. 145, n. 1, p. 27-33, 2010.

RIBEIRO, L.M.A.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO A.C.; KIM, C.A.E.; FOMIM, A.B.F.; CASTRO, A.P.B.M. Avaliação dos fatores associados a infecções recorrentes e/ou graves em pacientes com Síndrome de Down. *Jornal de Pediatria (Rio J)*. v. 79, n. 2, p. 141-148, 2003.

ROIZEN, N.J.; AMAROSE A.P. Hematologic abnormalities in children with Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. v. 46, p. 510-512, 1993.

ROIZEN, N.J.; PATTERSON, D. Down's syndrome. *Lancet*. v. 361, p. 1281-1289, 2003.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 47. n. 3. p. 303-308, 2001.

SANTOS, J.A. Estado nutricional, composição corporal e aspectos dietéticos, socioeconômicos e de saúde de portadores de Síndrome de Down [Dissertação]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa – Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, 2006.

SAWA, T.; OHSHIMA, H.; Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide*. v. 14, p. 91-100, 2006.

SCANDALIOS, J.G. Introduction to Oxyradicals. *Free Radicals Biology and Medicine*. v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. v. 10, n. 10, p. 308-313, 2004.

SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress, and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*. v. 267, p. 4904-4911, 2000.

SCULLY, C. Down syndrome and dentistry. *Dental Update*. v. 3, p. 193-196, 1976.

SHAPIRO, B.L. Down syndrome: a disruption of homeostasis. *American Journal of Medical Genetics*. v. 14, p. 241-269, 1983.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. Oxidative Stress. Editora Academic press. USA. p. 1-7, 1985.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1997.

SILVA, N.L.P.; DESSEN, M.A. Síndrome de Down: etiologia, caracterização e impacto na família. *Interação em Psicologia*. v. 6, n. 2, p. 167-176, 2002.

SIMÃO, A.N.C.; DICH, J.B.M.D.; BARBOSA, D.S.; CECCHINI, R.; DICH, I.M.D. Influence of uric acid and γ -glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition*. v. 24, p. 675-681, 2008.

SINDOOR, S.D. Down syndrome: A review of the literature. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. v. 84, p. 279-285, 1997.

SINET, PM. Metabolism of oxygen derivatives in Downs syndrome. In: Sinex, F.M.; Merrill, C.R.; editors. Alzheimer's Disease, Downs Syndrome and Ageing. New York: The New York Academy of Sciences. p. 83-94, 1982.

SINET, P.M.; LEJEUNE, J.; JEROME, H. Trisomy 21 (Down's syndrome), glutathione peroxidase, hexose monophosphate shunt and IQ. *Life Science*. v.24, p. 29-34, 1979.

SMITH, W.B. Recognizable Pattern of Human Malformations. 4^a ed. Jones LK, editora Philadelphia: W.B. Saunders Co; p. 10-12, 1988.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. Fundamentos de Genética. 4^a Ed. Guanabara Koogan, 2010.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies.* v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

STENE, J.; FISCHER, G.; STENE, E.; MIKKELSEN, M.; PETERSEN, E. Paternal age effects in Down's syndrome. *Annals of Human Genetics.* v. 40, p. 299-306, 1977.

STRAPAZZON, J.O. Análise do dano oxidativo e monitoramento do *status* antioxidante de pacientes de acidente botrópico [Dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2011.

SUETSUGU, M.; MEHRAEIN, P. Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. *Acta Neuropathologica.* v. 50, p. 207-210, 1980.

TAKASHIMA, S.; BECKER, L.E.; ARMSTRONG, D.L.; CHAN, F.W. Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with Down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Research.* v. 225, p. 1-21, 1981.

TAUB, J.W.; HUANG, X.; MATHERLY, L.H. Expression of Chromosome 21-Localized Genes in Acute Myeloid Leukemia: Differences between Down syndrome and non-Down syndrome blast cells and relationship to *in vitro* sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. *Blood.* v. 94, n. 4, p. 1393-1400, 1999.

THIEL, R.; FOWKES, E.W. Can cognitive deterioration associated with Down syndrome be reduced? *Medical Hypotheses.* v. 64, n. 3, p. 524-532, 2005.

THOMPSON & THOMPSON. Genetics in Medicine, 6^a ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 2001.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. v. 160, p. 1-40, 2006.

VALLE, F.C.; ALMA, J.M.; OLIVEIRA, C.M.; CANGIANE, L.H.; LEITE, G.B.; RODOVALHO, L.; SOUZA, J.L.S.; BÉRGAMO, D.N. Síndrome de Down: do diagnóstico ao acompanhamento multidisciplinar. *Pediatria Moderna*. v. 37, p. 333-345, 2001.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. v. 30. n. 5. p. 1323-1338, 2007.

VERMA, L.; MACDONALD, F.; LEEDHAM, P.; MCCONACHIE, M.; DHANJA, S.; HULTÉN, M. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet*. v. 352, n. 9121, p. 9-12, 1998.

VERTONGEN, F.; NEVE, J.; CAUCHIE P.; MOLLE, L. Zinc, copper, selenium and glutathione peroxidase in plasma and erythrocytes of Down's syndrome (trisomy 21) patients. Interpretation of some variations. In: Bratter, P.; Schramel, P., eds. Trace element Analytical chemistry in medicine and biology. v. 3. Berlin, New York: Walter de Gruyter & Co. p. 175- 181, 1984.

VIGO, C.A.G. Estudo citogenético-clínico da trissomia parcial do cromossomo 21 [Tese]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 1997.

ZACKS, M.A.; WEN, J.J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. v. 77, n. 4, p. 695-715, 2005.

ZAKHAROV, A.F. Theoretical aspects of medical genetics. Moscow: Meditsina, 1979.

ZANA, M.; JANKA, Z.; KÁLMÁN, J. Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. v. 28. p. 648-676, 2007.

ZANA, M.; SZÉCSÉNYI, A.; CZIBULA, Á.; BJELIK, A.; JUHÁSZ, A.; RIMANÓCZY, Á.; SZABÓ, K.; VETRÓ, Á. *et al.* Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 345. p. 726-733, 2006.

ZARATE, N.; MEARIN, F.; HIDALGO, A.; MALAGELADA, J.R. Prospective evaluation of esophageal motor dysfunction in Down's syndrome. *American Journal of Gastroenterology*. v. 96, n. 6, p. 1718-1724, 2001.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*.v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

WAGENBICHLER, P. Zur Aetiologie des Mongolismus. *Naturwissenschaften*. v.68, p. 76-81; 1981.

WARD, O.C. John Langdon Down: The man and the message. *Down Syndrome Research and Practice*. v. 6, n. 1, p. 19-24, 1999.

WEN, J.J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma Cruzi infection. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 37, p. 2072-2081, 2004.

WERNECK, C.. Muito prazer, eu existo: um livro sobre as pessoas com Síndrome de Down. 4ª ed. Rio de Janeiro. Ed. WVA, 1995.

WHO, World Health Organization. Down syndrome. World Health Organization. Genes and human diseases: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/print.html>. Acesso em: 07/07/12. Geneva, 2007.

WILHELM FILHO, D.; JÚNIOR, S.Á.; POSSAMAI, F.P.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; GARLET, T.R.; INÁCIO, D.B.; TORRES, M.A.; COLEPICOLA, P.; DAL-PIZZOL, F. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining

extraction and incineration of hospital residues. *Ecotoxicology*. v. 19, p. 1193-1200, 2010.

WILHELM FILHO, D.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.G.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in vertebrates: emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 7, p. 33-45, 2000.

WILSON, M.D. Special considerations for patients with Down syndrome. *Journal Oklahoma Dental Association*. v. 84, n. 3, p. 24-26, 1994.

WINDHAM, G.C.; BJERKEDAL, T.; LANGMARK, F. A population-based study of cancer incidence in twins and in children with congenital malformations or low birth weight, Norway, 1967-1980. *American Journal of Epidemiology*. v. 121, p. 49-56, 1985.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 29, n. 5, p. 403-409, 2000.

YANG, Q.; RASMUSSEN, S.A.; FRIEDMAN, J.M. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: population-based study. *Lancet*. v. 359, n. 9311, p. 1119-1125, 2002.

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO

PROJETO: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO ANTIOXIDANTE EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN.

Responsáveis: Danilo Wilhelm Filho, residente na Rodovia SC 405, 435A, Fazenda Rio Tavares, Florianópolis. Telefone: 048-32374145.

Eduardo Benedetti Parisoto, residente no município de São José – SC, Rua José Victor da Rosa, 94, Condomínio San Rafael, Bloco D, Apto 204. Telefone 048 88027013

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo **avaliar o estresse oxidativo e monitoramento do *status* antioxidante antes e após suplementação com vitaminas C e E em crianças com Síndrome de Down (SD).**

Esta pesquisa tem como principal benefício monitorar os níveis de marcadores de estresse oxidativo o que irá ajudar a esclarecer os danos causados pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio em pacientes com SD. Assim, com estes resultados podemos avaliar os benefícios da suplementação antioxidante frente ao desenvolvimento cognitivo e outros prejuízos relacionados aos danos oxidativos.

Os pesquisadores, Danilo Wilhelm Filho e Eduardo Benedetti Parisotto farão avaliação cognitiva e inquérito alimentar dos paciente do presente estudo. Para avaliação do estresse oxidativo, será realizada uma coleta de sangue de 5 ml.

Você tem a liberdade de querer participar desta pesquisa ou não, no caso de aceitação, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo à continuidade de seu tratamento. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer etapa do estudo, não existindo também, compensação financeira relacionada à sua participação. Também não haverá dano de qualquer natureza causado

diretamente pela pesquisa. Todos os dados coletados assim como os resultados desta pesquisa serão publicados e divulgados no meio científico sem qualquer identificação pessoal, mantendo sigilo e preservando a sua privacidade.

Esse documento será assinado em 2 (duas) vias por ambas as partes, uma pelo pesquisador responsável e outra por você.

*Eu, _____,
acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das
informações sobre o estudo citado, que li ou que foram lidas para mim.*

*Eu discuti com o pesquisador Eduardo Benedetti Parisoto sobre
a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros os
propósitos do estudo, os procedimentos realizados, seus desconfortos e
riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos
permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de
despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar
quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste
estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes
ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de
qualquer benefício que eu possa ter adquirido.*

Data: ____/____/____.

Assinatura do Responsável

Data: ____/____/____.

Assinatura dos Pesquisadores

ANEXO A**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM
SERES HUMANOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2112

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2112

FR: 470877

TÍTULO: Avaliação do estresse oxidativo antes e após suplementação antioxidante em crianças com Síndrome de down

AUTOR: Danilo Wilhelm Filho, Eduardo Benedetti Parisotto, Thais Regina Gallet

FLORIANÓPOLIS, 28 de Novembro de 2011.

Coordenador do CEPSH UFSC

Prof. Washington Pereira de Souza

